

Einfluss von Ausdauertraining auf die Mitochondrienfunktion  
von Ratten mit hoher und niedriger intrinsischer körperlicher Leistungsfähigkeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susanne Zeeb

geboren am 21.5.1992 in Stuttgart

**Gutachter**

1. Prof. Dr. Torsten Doenst, Jena
2. PD Dr. Michel Noutsias, Jena
3. PD Dr. Bernd Niemann, Gießen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6.6.2017

Tag des Staatsexamens: 30. und 31.5.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2 Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>8</b>
3.1 Ausdauerleistungsfähigkeit und Ausdauertraining	8
3.1.1 Effekte von Ausdauertraining auf die Gesundheit	8
3.1.2 Effekte von Ausdauertraining auf die Mitochondrien	9
3.2 Mitochondrien, Citratzyklus und Atmungskette	10
3.3 Mitochondrienschäden bei Krankheiten	13
3.4 HCR-LCR Modell	14
<b>4 Ziel der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>5 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
5.1 Versuchstiere	16
5.2 Geräte	16
5.3 Chemikalien	17
5.4 Puffer und Lösungen	19
5.5 Labormethoden	20
5.5.1 Laufbandtraining	20
5.5.2 Mitochondrienisolation	21
5.5.3 Messung der Citratsynthaseaktivität	24
5.5.4 Messung der respiratorischen Kapazität	25
5.5.5 Proteinbestimmung	29
5.5.6 Durchflusszytometrie	29
5.6 Statistische Methoden	30
<b>6 Ergebnisse</b>	<b>31</b>
6.1 Basale Unterschiede von HCR und LCR	31
6.1.1 Vergleich der Lauftests	31
6.1.2 Basale Unterschiede der Morphometrie	31
6.1.3 Basale Unterschiede der Mitochondrien	32
6.2 Effekte von Ausdauertraining	34
6.2.1 Effekte auf die Morphometrie	34
6.2.2 Effekte auf die Mitochondrien	35
<b>7 Diskussion</b>	<b>44</b>
7.1 Basale Mitochondrienfunktion von HCR und LCR	45
7.1.1 Citratsynthaseaktivität	45

7.1.2 Größe, Komplexität und Mitochondrienmenge.....	46
7.1.3 Maximale respiratorische Kapazitäten .....	47
7.2 Effekte von Training auf die Mitochondrienfunktion von HCR und LCR .....	49
7.2.1 Effekte auf die Citratsynthaseaktivität .....	49
7.2.2 Effekte auf die maximale respiratorische Kapazität.....	50
7.3 Morphometrie von HCR und LCR in Ruhe und nach Ausdauertraining .....	54
7.3.1 Morphometrie des Herzens der HCR und LCR und der Effekt von Ausdauertraining.....	54
7.3.2 Morphometrie des Skelettmuskels und Körpergewicht der HCR und LCR und der Effekt von Ausdauertraining .....	54
7.4 Unterschiede der IFM und SSM und Effekte von Training auf die IFM und SSM .....	56
<b>8 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>58</b>
<b>9 Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>10 Anhang .....</b>	<b>65</b>
10.1 Weitere Daten.....	65
10.2 Abbildungsverzeichnis .....	66
10.3 Tabellenverzeichnis.....	67
10.4 Ehrenwörtliche Erklärung .....	68
10.5 Danksagung .....	69

## 1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Aqua dest.</b>	-	Destilliertes Wasser
<b>ATP</b>	-	Adenosintriphosphat
<b>BSA</b>	-	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
<b>C</b>	-	Kontrolltiere, untrainierte Tiere
<b>C I – V</b>	-	Komplex I - V
<b>CACT</b>	-	Carnitin-Acylcarnitin-Transporter
<b>CoA</b>	-	Coenzym A
<b>CPT1</b>	-	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
<b>CytC</b>	-	Cytochrom C
<b>DTNB</b>	-	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, auch Ellmans Reagenz
<b>Ex</b>	-	Läufertiere, trainierte Tiere
<b>Gas</b>	-	M. gastrocnemius
<b>GDH</b>	-	Glutamat-Dehydrogenase
<b>HCR</b>	-	High capacity runners
<b>Hom</b>	-	Homogenat
<b>IFM</b>	-	Interfibrilläre Mitochondrien
<b>i.p.</b>	-	Intraperitoneal
<b>LCR</b>	-	Low capacity runners
<b>M.</b>	-	Musculus
<b>SDH</b>	-	Succinat-Dehydrogenase
<b>SEK</b>	-	Service-Einheit-Kleinnager
<b>Sol</b>	-	M. soleus
<b>SSM</b>	-	Subsarkolemmale Mitochondrien
<b>TNB</b>	-	2-Nitro-5-thiobenzoat
<b>UCP</b>	-	Uncoupling Protein
<b>VO<sub>2max</sub></b>	-	maximale Sauerstoffaufnahme
<b>β-HAD</b>	-	Beta-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase

## **2 Zusammenfassung**

### **Hintergrund**

Die Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums setzt sich aus der angeborenen intrinsischen Kapazität sowie der erworbenen extrinsischen Kapazität zusammen und ist ein starker Prädiktor für Mortalität und kardiovaskuläre Morbidität. Ratten mit hoher intrinsischer Leistungsfähigkeit (HCR) können längere Distanzen zurücklegen und erreichen höhere Laufgeschwindigkeiten als Ratten mit niedriger intrinsischer Leistungsfähigkeit (LCR). Außerdem haben sie ein anderes kardiovaskuläres Gesundheitsprofil, mit niedrigerem Blutdruck, Blutzucker- und Körpergewicht als die LCR. Ausdauertraining beeinflusst die extrinsische Kapazität und die Mitochondrienfunktion und hat einen Effekt auf Gesundheit und Mortalität. Weiterhin sind kardiovaskuläre Erkrankungen häufig mit Mitochondriendysfunktion assoziiert. Hierzu sollte die Hypothese untersucht werden, wonach der Effekt von Ausdauertraining auf die Mitochondrienfunktion der Ratte von der genetischen Prädisposition abhängt.

### **Methoden**

Weibliche Ratten mit hoher und weibliche Ratten mit niedriger intrinsischer Kapazität wurden in vier Gruppen unterteilt (HCR-C, HCR-Ex, LCR-C, LCR-Ex). Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase und Kapazitätstests trainierten Lauf-Tiere (Ex) vier Wochen mit individueller Geschwindigkeit nach einem Protokoll für aerobes Intervalltraining auf dem Laufband. Subsarkolemmale (SSM) und interfibrilläre Mitochondrien (IFM) wurden getrennt voneinander aus Herz- und Skelettmuskel isoliert. Zusätzlich wurden Mitochondrien aus der Leber isoliert. Anschließend wurden die Citratsynthaseaktivität sowie der Proteingehalt bestimmt. Die respiratorische Kapazität der Mitochondrien wurde polarografisch unter Zugabe verschiedener Substrate untersucht.

### **Ergebnisse**

HCR und LCR waren gleich alt und unterschieden sich auch in der Tibialänge nicht. Die LCR-Kontrolltiere waren signifikant schwerer und hatten in Relation zum Körpergewicht ein geringeres Herzgewicht. Die Gewichte von Leber, M. gastrocnemius, M. soleus und der Lunge waren in beiden Phänotypen nicht unterschiedlich.

Die trainierten HCR waren nach dem Laufbandtraining signifikant schwerer als die gleichalten HCR-Kontrolltiere, während sich das Körpergewicht der trainierten und der untrainierten LCR nicht unterschied. Auch M. soleus und Leber zeigten nur bei den HCR Veränderungen und waren nach dem Training vergrößert. In Relation zum Körpergewicht und zur Tibialänge

nahm als Zeichen für kardiale Hypertrophie das Gewicht des Herzens durch das Laufbandtraining bei HCR und LCR zu.

Die Citratsynthaseaktivität der untrainierten Tiere unterschied sich im M. gastrocnemius, in welchem die HCR-Kontrolltiere höhere Aktivitäten hatten als die LCR-Kontrolltiere. Auch die maximale respiratorische Kapazität unterschied sich bei den Tieren ohne Training nur in den IFM des M. gastrocnemius, in welchem bei den HCR mit mehreren Substraten signifikant höhere maximale respiratorische Kapazitäten gemessen wurden. Es hat sich herausgestellt, dass nach dem Training vor allem die IFM, aber auch die SSM der HCR aus dem Herzen und die IFM des Skelettmuskels eine erhöhte respiratorische Kapazität hatten. Die respiratorische Kapazität der HCR stieg mit dem Substrat Pyruvat/Malat in den IFM (und SSM) des Herzens um 38 % (37 %), mit Succinat/Rotenon um 29 % (21 %), mit Palmitoylcarnitin/Malat um 49% (5 %) und mit DHQ/Rotenon um 55 % (20 %). Auch die Citratsynthaseaktivität erhöhte sich entsprechend im Herzmuskel der HCR durch Training. Hingegen zeigten diese Mitochondrienpopulationen der LCR keine wesentlichen Veränderungen. Bei den SSM des M. gastrocnemius und in der Leber kam es bei HCR und LCR kaum zu Veränderungen der maximalen respiratorischen Kapazität und der Citratsynthaseaktivität durch Training.

### **Schlussfolgerung**

Ausdauertraining hatte einen stärkeren Einfluss auf die Mitochondrienfunktion im Herzen und im Skelettmuskel der HCR als auf die der LCR. Die Körper- und Organgewichte von HCR und LCR durch Training wurden unterschiedlich beeinflusst, was auf vom Phänotyp abhängige Anpassungen der Gesamtorganismen, sowie der einzelnen Organe (Leber und Skelettmuskel) durch Ausdauertraining hinweist. Dies zeigt, dass die genetische Prädisposition für hohe körperliche Leistungsfähigkeit den Effekt von Ausdauertraining auf die Mitochondrienfunktion beeinflusst.

## **3 Einleitung**

### **3.1 Ausdauerleistungsfähigkeit und Ausdauertraining**

Die Ausdauerleistung, die ein Organismus beispielsweise auf einem Laufband verrichten kann, ist die Summe aus der angeborenen intrinsischen und der erworbenen extrinsischen Leistung (Henderson et al. 2002). So haben die genetische Ausstattung und auch multiple Umweltfaktoren einen Einfluss auf die individuelle Leistungsfähigkeit. Die Stärke des Effekts der Umweltfaktoren hängt auch von der genetischen Ausstattung ab; es gibt also eine sogenannte genetische Prädisposition für Umweltfaktoren wie beispielsweise Training. Die genetische Ausstattung hat einen hohen Anteil an der Gesamtleistungsfähigkeit, er wird auf bis zu 70 % geschätzt (Bouchard et al. 1986). Dass bei monozygoten, nicht aber dizygoten Zwillingen, welche unterschiedlich sportlich aktiv sind, die Lebenserwartung gleich ist, spricht ebenso für eine zentrale Bedeutung der angeborenen Kapazität in Bezug auf das Mortalitätsrisiko (Kujala et al. 2002). Auch das Risiko, an koronarer Herzkrankheit zu erkranken, war bei olympischen Ausdauersportlern, die sich dementsprechend auch schon als Kinder für Ausdauersport eigneten und denen man eine hohe intrinsische Kapazität unterstellen kann, niedriger als bei Kraftsportlern oder Nichtsportlern (Kujala et al. 2000). Neben der Genetik kann auch Ausdauertraining als extrinsischer Faktor die Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums (Huang et al. 2005) und dessen Gesundheit und Mortalität beeinflussen (Oguma et al. 2002, Andersen et al. 2000).

#### **3.1.1 Effekte von Ausdauertraining auf die Gesundheit**

Ausdauerleistungsfähigkeit ist ein starker Prädiktor für die Gesamtmortalität bei Gesunden (Ekelund et al. 1988), bei Patienten mit Typ 2 Diabetes (Church et al. 2004) und bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (Myers et al. 2002). Zwischen Trainingsumfang und Gesamtmortalität ist bei Männern wie bei Frauen sogar von einer Dosis-Wirkungsbeziehung auszugehen (Lee und Skerrett 2001). So geht niedrige Ausdauerleistungsfähigkeit mit einer erhöhten Mortalität einher (Blair et al. 1989), während hohe Leistungsfähigkeit die Gesamtmortalität reduziert. Bei hoher Leistungsfähigkeit konnte auch das seltenere Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit beobachtet werden (Kodama et al. 2009). Eine Verbesserung der Insulinsensitivität bei Gesunden (Houmard et al. 1999, Youngren et al. 2001) sowie bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2



(Dela et al. 1995) konnte bereits nach sieben Tagen Ausdauertraining beobachtet werden. Die Mechanismen, über welche Ausdauertraining zur Steigerung der Leistungsfähigkeit und Gesundheit führt, sind vielfältig (Coffey und Hawley 2007, Gielen et al. 2010). Ein wesentlicher Mechanismus ist die Beeinflussung der Mitochondrienfunktion und des Mitochondrienstoffwechsels (Holloszy et al. 1970, Drake et al. 2016).

### **3.1.2 Effekte von Ausdauertraining auf die Mitochondrien**

Es ist bekannt, dass Ausdauertraining zu einer Erhöhung des Sauerstofftransportpotentials sowie des oxidativen Potentials des Skelettmuskels führt (Holloszy 1967, Walsh et al. 2001). Zu diesen Trainingseffekten können mehrere Mechanismen führen. Erstens wird quantitativ die mitochondriale Dichte erhöht (Hoppeler 1986), was unter anderem durch die Aktivierung der Biogenese von interfibrillären und subsarkolemmalen Mitochondrien im Trainingszeitraum (Adhihetty et al. 2003) erklärt werden kann. Zweitens verändert sich die Funktion der Mitochondrien durch Ausdauertraining auch qualitativ. So sind die Aktivität und die absolute Proteinmenge der Enzyme des Citratzyklus und der Atmungskette, wie etwa der Succinat-Dehydrogenase (Henriksson 1977, Holloszy 1967) und der Citratsynthase (Carter et al. 2001, Holloszy et al. 1970), nach dem Training erhöht. Infolgedessen ist die maximale ATP-Produktion gesteigert (Holloszy 1967) und der Sauerstoffverbrauch erhöht (Henriksson 1977, Holloszy 1967). In den Mitochondrien verändert sich durch Ausdauertraining auch die Verwertung von Energiesubstraten. Es werden vermehrt Fettsäuren verstoffwechselt (Bylund et al. 1977, Henriksson 1977), eine Erhöhung der Aktivität der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase ist zu beobachten (Gillen et al. 2014).

Die Aktivitäts- und Mengenerhöhung der mitochondrialen Enzyme führt letztlich zur Erhöhung der maximalen respiratorischen Kapazität der Mitochondrien des Skelettmuskels (Walsh et al. 2001), was wiederum eine erhöhte Ausdauerleistung nach dem Training erklären kann (Walsh et al. 2001). Verschiedene Trainingsmethoden können zu ähnlichen mitochondrialen Veränderungen führen. So kann neben Ausdauertraining auch intensiveres Intervalltraining mit nur dreimaliger zehnminütiger Belastung pro Woche beim Menschen zu einer Erhöhung der oxidativen Kapazität des Skelettmuskels führen (Gillen et al. 2014). Allerdings darf der Trainingsstimulus nicht zu gering sein. Eine halbe Stunde Schwimmen am Tag führte bei Ratten nicht zur Erhöhung von mitochondrialen Enzymaktivitäten. Es konnte in einem Trainings-

zeitraum von fünf bis acht Wochen kein Effekt auf die Succinat-Dehydrogenase (Hearn und Wainio 1956) oder Malat-Dehydrogenase (Gould und Rawlinson 1959) beobachtet werden.

Die Effekte von Ausdauertraining können nach mehrwöchiger Inaktivität reversibel sein. Es nehmen dann sowohl die respiratorische Kapazität (Ryan et al. 2013) als auch die einzelnen Enzymaktivitäten wieder deutlich ab (Chi et al. 1983).

Mitochondrien der Herzmuskelzellen scheinen anders auf Ausdauertraining zu reagieren als die der Skelettmuskeln. Zwar ist ihre Trainingsanpassung noch nicht im gleichen Umfang untersucht, dennoch lässt sich hier ein entgegengesetzter Effekt ablesen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass wiederholtes Training zu einer vorübergehenden mitochondrialen Dysfunktion im Myokard führen kann (Schoepe et al. 2012). Sowohl die respiratorische Kapazität als auch die Aktivitäten von Komplex I und IV waren nach sechswöchigem Training erniedrigt, passten sich jedoch nach zehn Wochen Training wieder an den Ausgangszustand an (Schoepe et al. 2012). Wie bereits im Skelettmuskel spielte die Trainingsform bei adäquatem Reiz keine dominierende Rolle. Auch bei sehr zeitaufwändigem Training von sechs Stunden Schwimmen pro Tag war eine Reduktion der maximalen respiratorischen Kapazität messbar (Leichtweis et al. 1997). Im Gegensatz dazu war die Citratsynthaseaktivität des Herzmuskels nach achtwöchigem Laufbandtraining (Siu et al. 2003) sowie die Palmitat-Oxidation von Rattenmitochondrien durch zwölfwöchiges Lauftraining (Dohm et al. 1972) nicht verändert. Im Herzmuskel sind die biochemischen Veränderungen durch Training also wohl komplexer oder in größerem Umfang vom genauen Trainingsprotokoll abhängig als im Skelettmuskel.

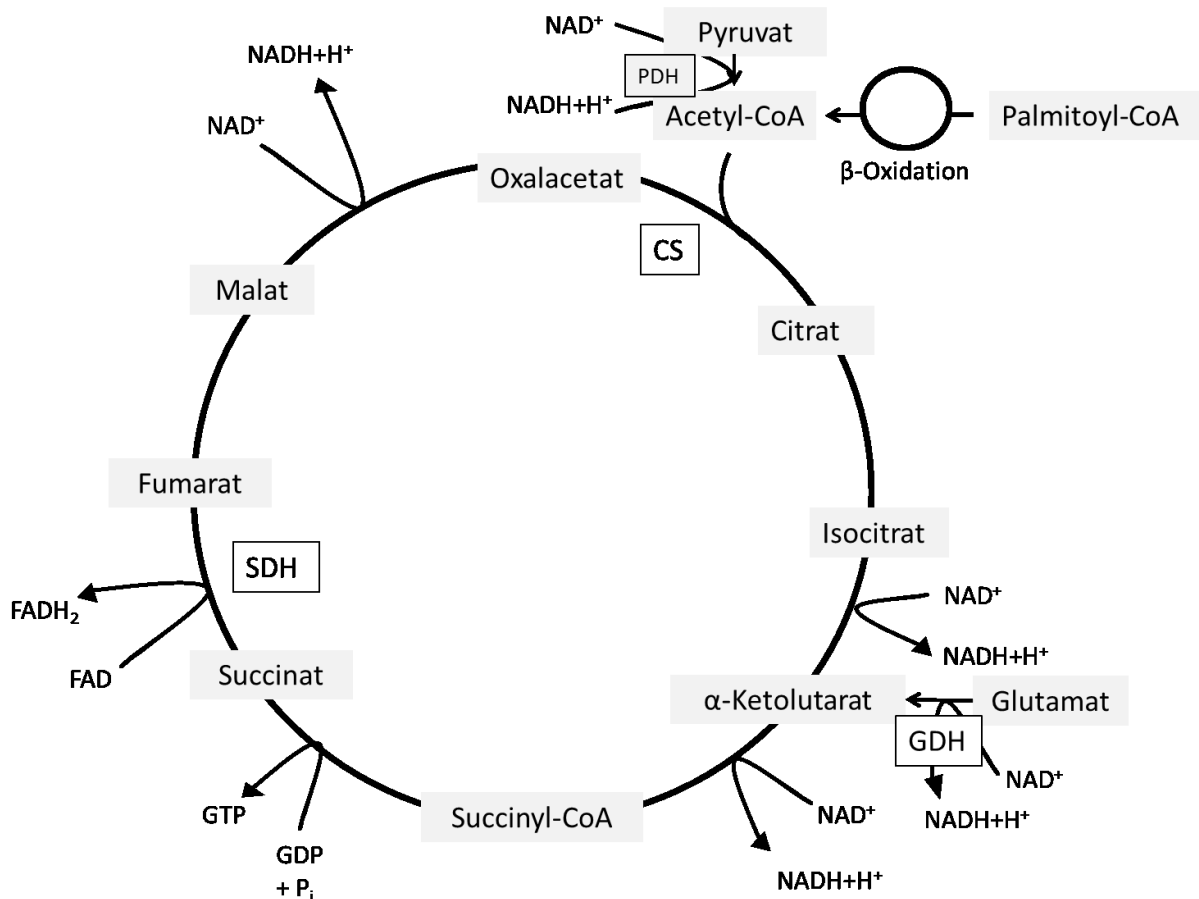
Zum besseren Verständnis der Arbeit werden im Folgenden die Grundlagen des mitochondrialen Metabolismus beschrieben.

### **3.2 Mitochondrien, Citratzyklus und Atmungskette**

Mitochondrien produzieren den Hauptteil des Adenosintriphosphates (ATP) der Zelle und stellen damit Energie in Form von energiereichen Bindungen bereit (Saraste 1999). Diese Energie wird für viele Zellprozesse wie beispielsweise die Muskelkontraktion benötigt. Im Muskel kommen zwei unterschiedliche Arten von Mitochondrien vor (Palmer et al. 1977). Subsarkolemmale Mitochondrien (SSM), die sich unter der Plasmamembran (Sarkolemm) befinden und interfibrilläre Mitochondrien (IFM), welche zwischen den Muskelfibrillen lokalisiert sind (Bizeau et al. 1998). Neben der örtlichen Lage unterscheiden sie sich auch in ihren

biochemischen Eigenschaften (Palmer et al. 1977). Für die vorliegende Arbeit wurden die Populationen im Skelett- und Herzmuskel separat isoliert und untersucht.

Der Citratzyklus (Abb. 1) ist einer der wesentlichen Stoffwechselwege für die Energieproduktion der Zelle. Er läuft in der mitochondrialen Matrix ab und dient neben der Bereitstellung von Biosynthesezwischenprodukten auch dem oxidativen Abbau organischer Metaboliten, welche zur aeroben Energiegewinnung genutzt werden.

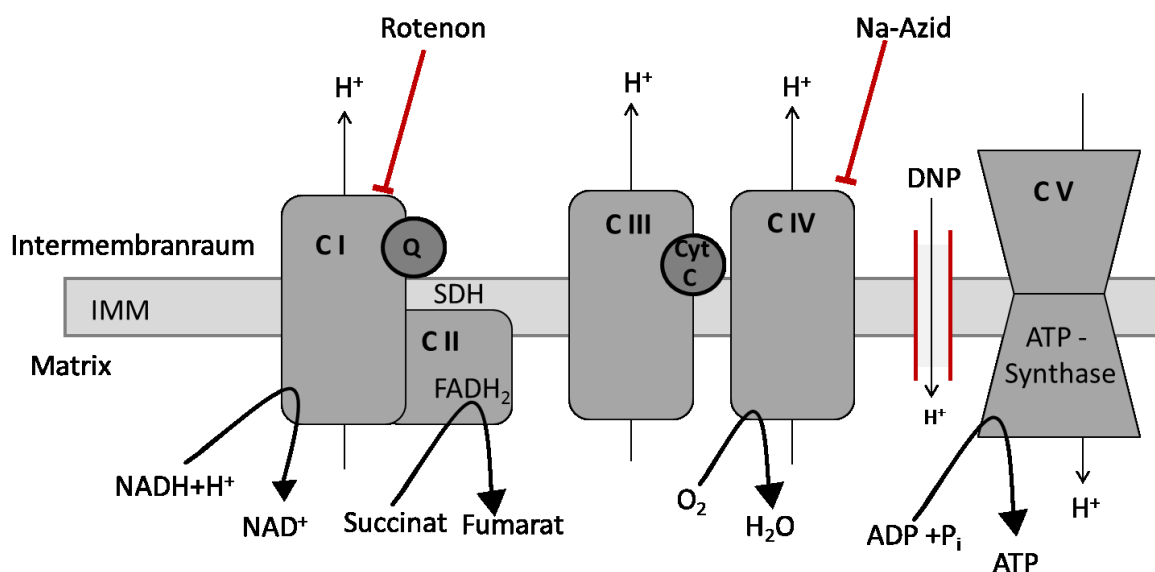


**Abbildung 1** - Schematische Darstellung des Citratzyklus. Dargestellt sind die Schritte, bei denen die Reduktionsäquivalente  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  entstehen. Weiter wird die Einschleusung der Substrate Pyruvat durch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), von Glutamat durch die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und von Palmitoyl-CoA gezeigt. Schließlich ist die Citratsynthase (CS) als Schlüsselenzym des Zyklus dargestellt.

Die Citratsynthase (CS) ist das Leitenzym des Zyklus. Sie katalysiert die Kondensation von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat zu Citrat und CoA-SH. Die Citratsynthaseaktivität ist einer der besten Marker für den mitochondrialen Gehalt (Larsen et al. 2012) und die oxidative Kapazität (Blomstrand et al. 1997) eines Gewebes. Sie unterliegt einer starken Anpassung bereits während des Ausdauertrainings, doch vor allem danach (Holloszy et al.

1970). So ist die Citratsynthaseaktivität des Skelettmuskels laut den meisten Studien nach dem Training erhöht (Bylund et al. 1977, Bruce et al. 2004).

Unterschiedliche Metaboliten können in den Citratzyklus eingeschleust werden. Dazu zählen sowohl Zucker als auch Fettsäuren und Aminosäuren. Die meisten Zwischenprodukte treten als Acetyl-CoA in den Citratzyklus ein. So auch Glukose, die durch die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut wird, um dann durch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA metabolisiert zu werden. Fettsäuren hingegen durchlaufen die  $\beta$ -Oxidation, wobei sie schrittweise zu Acetyl-CoA abgebaut werden. Sie benötigen ein spezielles Transportsystem, das Carnitin-Acyltransferase System, um in die mitochondriale Matrix zu gelangen. Aminosäuren gelangen durch anaplerotische, also auffüllende Reaktionen in den Citratzyklus. Zum Beispiel katalysiert die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) die Oxidation von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat, wobei  $\text{NADH} + \text{H}^+$  entsteht. Beim Ablauf des Citratzyklus entstehen Guanosintriphosphat (GTP) als energiereiches Nukleosidtriphosphat, sowie die Reduktionsäquivalente NADH und  $\text{FADH}_2$ , welche in die Atmungskette eingeschleust werden können.



**Abbildung 2** - Stark vereinfachte Darstellung der Atmungskette. Die Atmungskettenkomplexe CI - CV, welche Elektronen transportieren, sind in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisiert. Durch die Komplexe I, III und IV werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. So entsteht ein Protonengradient, welcher von Komplex V zur ATP-Synthase genutzt wird. Komplex II ist die Succinat-Dehydrogenase (SDH), welche die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert. Ubichinon (Q) und Cytochrom C (Cyt C) fungieren als Elektronenüberträger. Rotenon, Na-Azid und DNP sind als spezifische Inhibitoren einzelner Komplexe rot dargestellt. DNP fungiert als Entkoppler und transportiert Protonen vom Intermembranraum zurück in die Matrix.

Die Atmungskette (Abb. 2) ist eine Elektronentransportkette, die an und in der inneren Mitochondrienmembran abläuft. Sie besteht aus den Elektronenüberträgern Ubichinon und Cytochrom C, sowie den Atmungskettenkomplexen I bis V. Die Komplexe I, III und IV bauen einen Protonengradienten über der inneren mitochondrialen Membran auf, indem Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Dafür werden die Substrate der Atmungskette  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  benötigt. Sie stammen im Wesentlichen aus dem Citratzyklus, der in der Mitochondrienmatrix abläuft. Der Abbau des Gradienten an Komplex V (ATP-Synthase) liefert die Energie zur ATP-Synthese (Ballinger 2005). Intakte mitochondriale Stoffwechselwege und die Funktionalität der Atmungskette sind wesentlich für die Energieversorgung der Zelle sowie für Gesundheit und Ausdauerleistungsfähigkeit eines Organismus.

### **3.3 Mitochondrienschäden bei Krankheiten**

Mitochondriale Dysfunktionen spielen eine wesentliche Rolle bei zahlreichen Erkrankungen. Vor allem Organe mit hohem Energieverbrauch wie Herz, Gehirn und Skelettmuskel werden durch Fehlfunktion der Mitochondrien beeinflusst. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist beispielsweise die respiratorische Kapazität um 25 % erniedrigt. Die Aktivität der Citratsynthase, sowie des Komplexes IV ist ebenfalls reduziert (Garnier et al. 2009).

Störungen der Mitochondrienfunktion begünstigen weiterhin die Entstehung von anderen kardiovaskulären Erkrankungen (Ballinger 2005). Risikofaktoren wie Zigarettenrauch (Knight-Lozano et al. 2002) oder hohe Glukosekonzentration (Li et al. 2001) können mitochondriale Dysfunktion verursachen und möglicherweise über diesen Weg zu Folgeerkrankungen führen. So ist auch im metabolischen Krankheitsbild des Diabetes mellitus ein mitochondrialer Schaden eine Ursache für die Entstehung der krankheitstypischen Symptome (Lowell und Shulman 2005, Johnsen et al. 2013b). Es zeigte sich weiterhin, dass die Kinder von Patienten mit Typ 2 Diabetes die gleichen Defekte der Mitochondrienbiogenese wie ihre Eltern hatten, welche im Alter schließlich zu einer verschlechterten Fettsäureoxidation und letztendlich Insulinresistenz führten (Befroy et al. 2007). Neben erworbenen Mitochondrienschäden spielt also auch eine genetische Komponente eine wesentliche Rolle. Der Einfluss von genetischen und von erworbenen Komponenten ist jedoch generell nur schwierig voneinander zu trennen. Im Folgenden wird das verwendete Tiermodell zur getrennten Untersuchung von genetischen und erworbenen Einflüssen auf die Ausdauerleistungsfähigkeit beschrieben.

### 3.4 HCR-LCR Modell

Zur differenzierten Untersuchung von extrinsischer (erworbener) und intrinsischer (genetischer) körperlicher Ausdauerleistungsfähigkeit existiert ein Tiermodell. Koch und Britton züchteten besonders leistungsfähige beziehungsweise leistungsschwache Ratten, welche sich stark in ihrer intrinsischen körperlichen Ausdauerleistungsfähigkeit unterscheiden (Koch und Britton 2001). Diese high capacity runners (HCR) mit hoher intrinsischer Leistungsfähigkeit beziehungsweise low capacity runners (LCR) mit niedriger intrinsischer Leistungsfähigkeit stammen von einer genetisch heterogenen N:NIH Population aus 96 Weibchen und 96 Männchen ab. Jedes dieser 192 Tiere besaß unterschiedliche Eltern. Von ihnen wurden jeweils die 13 Tiere gekreuzt, welche auf einem Laufband die höchsten bzw. niedrigsten Maximalgeschwindigkeiten erreichten. Ihre Nachfolgeneration wurde mit 10 Wochen ebenfalls an das Laufband gewöhnt und nach ihrer individuellen Leistung getestet, woraufhin die Zucht fortgesetzt wurde (Koch und Britton 2001). Durch spezielle Rotationen bei der Zucht konnte ein Inzuchtfaktor von unter 1 % pro Generation erreicht werden (Ren et al. 2013), sodass die große genetische Heterogenität der Tiere eine Besonderheit dieses Tiermodells darstellt.

In der sechsten Generation waren schließlich deutliche Unterschiede der Ausdauerleistungsfähigkeit im Vergleich zur ersten Generation zu bemerken. Während die Ausdauer der Nachkommen der HCR-Weibchen um 140 % gesteigert war, sank die der LCR-Weibchen um 18 % (Koch und Britton 2001). Außerdem wurde eine Gewichtszunahme in jeder LCR Generation verzeichnet, während sich das Körpergewicht der HCR stetig verringerte (Koch und Britton 2001). Die maximale Sauerstoffaufnahme ( $VO_{2max}$ ) als Maß für die Ausdauerleistungsfähigkeit ist einer der wesentlichen Unterschiede zwischen HCR und LCR. Männliche (Torma et al. 2014) und weibliche (Gonzalez et al. 2006) HCR haben eine wesentlich höhere  $VO_{2max}$  als vergleichbare LCR. Die Unterschiede zwischen HCR und LCR beschränken sich jedoch nicht nur auf das Körpergewicht und die Leistungsfähigkeit. HCR haben eine um 45 % erhöhte Lebenserwartung verglichen mit LCR (Koch et al. 2011) und ebenso sind die kardiovaskulären Risikofaktoren unterschiedlich ausgeprägt (Wisloff et al. 2005). So haben LCR im Vergleich zu HCR Tieren vermehrt viszerales Fett, höhere Plasmatriglyceridlevel, eine geringere Glukosetoleranz sowie einen gesteigerten 24-Stunden-Blutdruck (Wisloff et al. 2005). Bei weiblichen LCR wurden zwar normale Blutdruckwerte festgestellt, dennoch entwickelten sie vermehrt eine interstitielle Fibrose im Myokard und hatten eine diastolische Dysfunktion (DeMarco et al. 2012).

## 4 Ziel der Arbeit

Der große Einfluss der Gene auf die Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums ist bekannt. Die Bedeutung von Ausdauerleistungsfähigkeit und Ausdauertraining für die Gesundheit ebenso. Des Weiteren ist eine gute Mitochondrienfunktion für Ausdauer und Gesundheit eines Individuums von zentraler Bedeutung. Wie genau der Effekt des Trainings auf die Mitochondrien von der angeborenen Ausdauer abhängt, ist unklar. Um dies zu klären, wurden in dieser Arbeit Mitochondrien von Ratten mit hoher und mit niedriger intrinsischer Ausdauerleistungsfähigkeit untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt eines vierwöchigen, individuell-aeroben Intervalltrainings auf die Mitochondrienfunktion von HCR- und LCR-Weibchen zu ermitteln. Dazu wurde die maximale respiratorische Kapazität gemessen. Es sollte die Hypothese geprüft werden, wonach dieser Effekt von der genetischen Prädisposition, also vom Phänotyp der Ratten abhängt. Da die LCR pathologische Veränderungen im Metabolismus haben, vermuteten wir eine Mitochondrienfehlfunktion. Deshalb war die Hypothese, dass sich die respiratorische Kapazität der HCR durch Training stärker erhöht als die der LCR. Weiter sollten die Effekte des Trainings auf die beiden Mitochondrientypen IFM und SSM getrennt beobachtet werden, um die möglicherweise unterschiedlichen Funktionen der Mitochondrienpopulationen bei der Energiebereitstellung zu eruieren.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

Es wurden 45 weibliche Ratten (HCR und LCR), welche Kinder der Generation 33 waren, für die Experimente verwendet. Sie wurden im SEK des Forschungszentrums Jena-Lobeda gehalten. Hierbei wurde auf eine möglichst große genetische Vielfalt geachtet. Es wurden sechs verschiedene HCR und sechs verschiedene LCR-Elternpaare für die Zeugung der Versuchstiere ausgewählt und Geschwister möglichst sowohl zur Kontroll- als auch zur Trainingsgruppe zugeordnet. Die Elternpopulation wurde von der University of Michigan, Department of Anesthesiology, bezogen. Davon waren 16 LCR mit niedriger intrinsischer Leistungsfähigkeit und 16 HCR mit hoher intrinsischer Leistungsfähigkeit. Der Licht/Dunkel- Zyklus war 12h/12h und die Ratten wurden mit ein bis vier Geschwistern gleichen Geschlechts in Käfigen gehalten. Die Tiere bekamen Normalkost und Wasser. Alle Tierversuche wurden durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt.

### 5.2 Geräte

In Tabelle 1 sind die für die Anfertigung der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 1-** verwendete Geräte

Experiment	Gerät	Firma
Laufbandtraining	Exer-3R Treadmill (Serial: 05118-1, 230 VAC)	Columbus Instruments (Columbus, USA)
Mitochondrienisolation	Glas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit einem locker passenden Teflon-Pistill, angetrieben von einem RE 16 Rührgerät (25W, 2000 bzw. 750 U/min)	Janke & Kunkel - IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
	Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA)
	Ultra-Turrax T25 (600 W, 8750 U/min) mit einem S25N-18G Dispergierwerkzeug	IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
	Waage (Model: 440-47N)	Kern & Sohn GmbH



	Feinwaage (Model: 120-4)	(Balingen-Frommern, Deutschland) Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Citratsynthaseaktivitäts-, Proteinbestimmung	Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader	Biotek (Winooski, VT, USA)
Messung der respiratori- schen Kapazität	Dual-Channel Oxygen Meter (Model 782)	Warner Instruments LLC (Hamden, CT, USA)
	Sauerstoffelektrode mit Mitocell MT200A	Strathkelvin (Glasgow, Schottland)
	UV-Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
	Direktverdrängerpipetten (50µl und 25µl)	Gilson, Inc. (Middleton, USA)
Durchflusszytometrie	Durchflusszytometer FC500	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)

## 5.3 Chemikalien

In Tabelle 2 sind die für die Anfertigung der Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 2** - verwendete Chemikalien

<sup>1</sup> - Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA; <sup>2</sup> - Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie (alternativer Name)	Firma
Acetyl-CoA-Trilithium-Salz	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
ADP (Adenosindiphosphat)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Bovines Serum Albumin, entfettet	Sigma Aldrich <sup>1</sup>

Carnitin	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
DHQ (Tetramethyldihydroquinon)	TCI America, Portland,OR, USA
DNP (2,4-Dinitrophenol)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
DTNB (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth <sup>2</sup>
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Carl Roth <sup>2</sup>
Glutamat (L-Glutaminsäure Natriumsalz)	Carl Roth <sup>2</sup>
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth <sup>2</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumphosphat; KPi)	Carl Roth <sup>2</sup>
KOH (Kaliumhydroxid)	Carl Roth <sup>2</sup>
Malat (Mononatriumsalz)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Mannitol	Carl Roth <sup>2</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Carl Roth <sup>2</sup>
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	Carl Roth <sup>2</sup>
Na-Azid	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
NaCl 0,9 %	Serumwerk, Bernburg, Deutschland
NADH (Nicotinamidadenindinukleotid)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (Natriumsulfit)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Oxalessigsäure (98 %)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Palmitoylcarnitin	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Palmitoyl-CoA	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Protein Assay Dye Reagent Concentrate #500-0006	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pyruvat	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Rotenon	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Succinat	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Sucrose	Sigma Aldrich <sup>1</sup>

Thiopenthal	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
TMPD (Tetramethylphenylendiamin)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Triton X-100	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Trizma (Tris)	Sigma Aldrich <sup>1</sup>
Trypsin	Sigma Aldrich <sup>1</sup>

## 5.4 Puffer und Lösungen

In Tabelle 3, 4 und 5 sind die Inhaltsstoffe der verwendeten Lösungen für die Mitochondrienisolation aufgeführt.

**Tabelle 3** – Herstellung von CP1 und CP2

	CP1	CP2
Stocklösung	Aqua dest. mit 100 mM KCl 50 mM MOPS 1 mM EGTA 5 mM MgSO <sub>4</sub> pH 7,4 mit 10 M KOH eingestellt	
am Tag der Isolation hinzugegeben		
ATP	60,6 mg je 100 ml Stocklösung	60,6 mg je 100 ml Stocklösung
BSA 5 %	-	4 ml je 100 ml Stocklösung

ATP bzw. BSA wurden frisch zugegeben, da diese Chemikalien mit der Zeit spontan zerfallen und zu Pilzbefall der Lösung führen können.

**Tabelle 4** - Herstellung von 2xKM und KME

<b>2xKM</b>	Aqua dest. mit 200 mM KCl 100 mM MOPS pH mit KOH (10 M) auf 7,4 einstellen
<b>KME</b>	Aqua dest. mit 100 mM KCl (aus 2xKM) 0,5 mM EGTA pH mit Tris (pH8,5) auf 7,4 einstellen

**Tabelle 5** - Herstellung von Wasch- und Isolationspuffer

	Waschpuffer	Isolationspuffer
Stocklösung	Aqua dest. mit 200 mM Mannitol 10 mM Sucrose 5 mM HEPES	
	pH mit KOH (1 M) auf 7,4 einstellen	<b>dazu</b> 1 mM EGTA

In den folgenden Tabellen sind die Bestandteile der Lösungen für die Messung der Citratsynthaseaktivität (Tab. 6) und für die Messung der respiratorischen Kapazität (Tab. 7) aufgeführt.

**Tabelle 6** - Herstellung von KEA

<b>KEA</b>	Aqua dest. mit 180 mM KCl 10 mM EDTA 0,5 % BSA pH mit Tris (pH8,5) auf 7,4 einstellen
------------	---

**Tabelle 7** - Herstellung von Respirationsgemisch

<b>Respirationsgemisch</b>	Aqua dest. mit 100 mM KCl 1 mM EGTA 5 mM KPi 1 mg/ml BSA
----------------------------	--

## 5.5 Labormethoden

### 5.5.1 Laufbandtraining

Das Laufbandtraining wurde auf Laufbändern der Firma Columbus Instruments (Exer-3R Treadmill) bei einer Steigung von 25° durchgeführt. Um die Tiere an das Training zu gewöhnen wurden sie an je drei Eingewöhnungstagen jeweils 15 min bei 13 m/min (HCR) oder 4 m/min (LCR) mit dem Laufband vertraut gemacht.

Das Trainingsprotokoll wurde auf die individuelle Maximalgeschwindigkeit der Ratten angepasst. Dazu wurden die Ratten im Alter von rund 10,5 Wochen dreimalig einem Kapazitätstest unterzogen, bei dem die Geschwindigkeit nach einer 15-minütigen Einlaufphase alle 2 min um 1,8 m/min gesteigert wurde. HCR hatten eine Einlaufgeschwindigkeit von 13 m/min, LCR eine von 4 m/min. Als Abbruchkriterium galt bei den HCR 3 x 5 Sekunden oder 15 Sekunden am Stück auf der elektrischen Stimulationseinheit und bei den LCR 6 x 5 Sekunden oder 30 Sekunden am Stück auf der elektrischen Stimulationseinheit. Diese Abbruchkriterien galten auch beim Lauftraining. Bei den HCR wurden die Mittelwerte aus den drei Kapazitätstests errechnet, bei den LCR galt der höchste der drei Werte als maximale Laufkapazität (100 %). Die Tiere wurden dann vier Wochen lang an je fünf aufeinanderfolgenden Tagen trainiert. Das Protokoll war in 15 Minuten Erwärmung bei 45 % der ermittelten Leistungskapazität und 90 Minuten Intervalltraining unterteilt. Die 90 Minuten waren in neun Abschnitte von je acht Minuten bei 85 % und zwei Minuten bei 55 % der maximalen Kapazität gegliedert.

Wenn die Tiere mindestens drei der fünf Trainingstage erfolgreich, also ohne Abbruch, absolviert hatten, wurde in der darauffolgenden Woche die Geschwindigkeit um 1,2 m/min erhöht. Die Tiere hatten am Tag vor der Isolation der Mitochondrien ihr letztes Laufbandtraining.

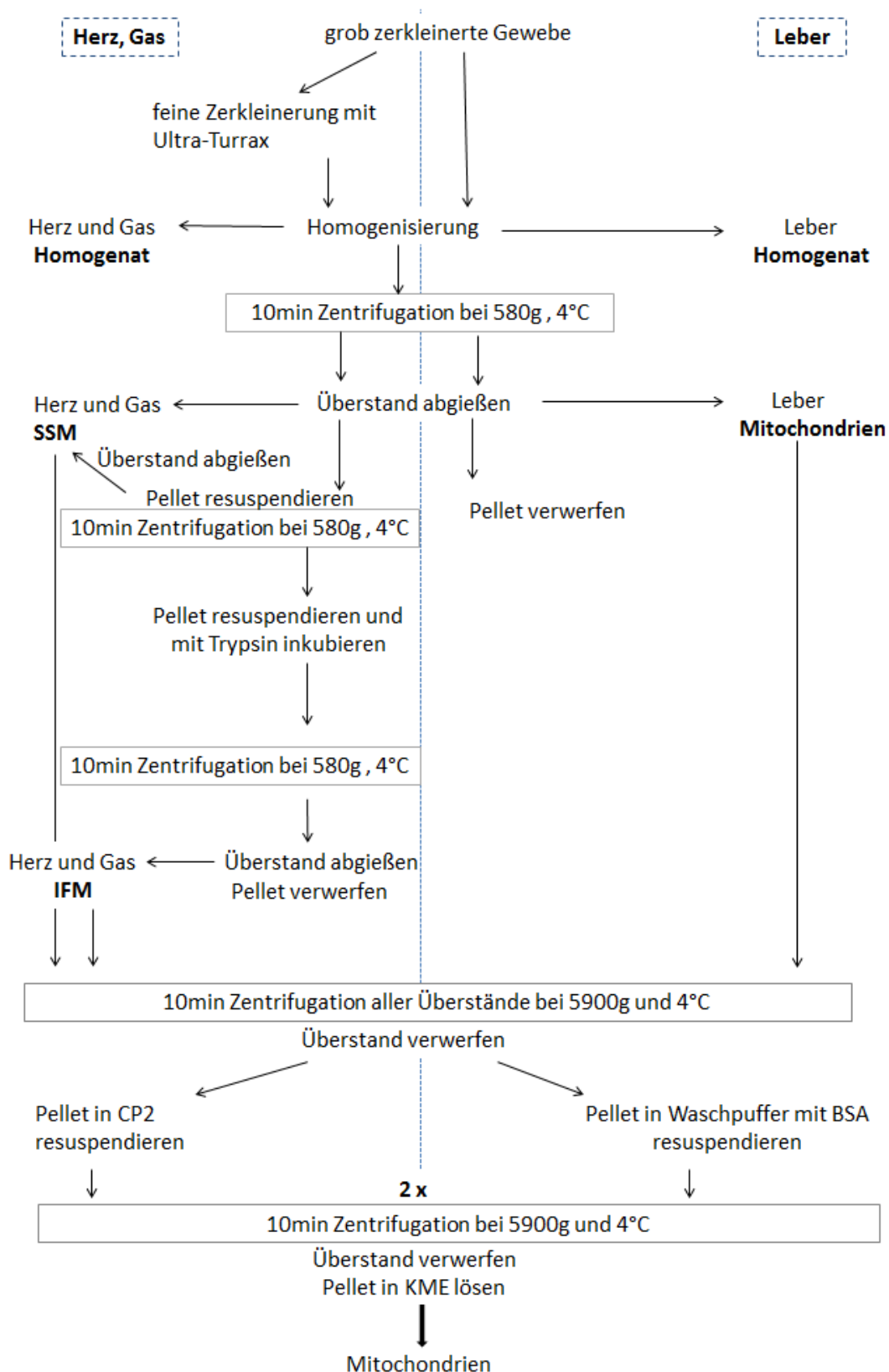
### **5.5.2 Mitochondrienisolation**

Die Isolation der Mitochondrien wurde bei den 15 Wochen alten Ratten nach dem Verfahren der differentialen Zentrifugation nach Palmer vorgenommen (Palmer et al. 1977). Dabei wurden IFM, welche sich zwischen den Muskelfibrillen befinden, und SSM, die unter dem Sarkomem liegen, voneinander getrennt isoliert. SSM können durch mechanische Zerstörung der Zellen frei werden, während man einen proteolytischen Abbau der Fibrillen durchführen muss, um an die IFM zu gelangen. Abbildung 3 zeigt ein Flussdiagramm der einzelnen Isolationsschritte.

Die Ratten wurden mit Thiopental i.p. (15 mg/100 g Körpergewicht) narkotisiert. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt und das Herz-Lungenpaket beziehungsweise die Leber entnommen und in CP1 beziehungsweise Isolationspuffer gelegt. Nach Präparation und Entnahme des M. gastrocnemius (Gas) und des M. soleus (Sol), zwei Muskeln der Hinterbeine, wurden alle Organe trockengelegt und einzeln gewogen. Vom Herzen wurde ca. 500 mg, vom M. gastrocnemius ca. 1500-2000 mg und von der Leber

ca. 1500 g eingewogen und für die Isolation verwendet. Die Organreste wurden für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren. Nach grober Zerkleinerung mit der Schere und Suspension in CP2 (10 ml/g eingesetztes Gewebe) wurden die Proben aus Herz und M. gastrocnemius mit dem Ultra Turrax T25 bei 9000 rpm für 2,5 sec fein zerkleinert. Die Proben aus der Leber wurden in Isolationspuffer gelegt. Anschließend wurden alle Proben mit dem Potter-Homogenisator homogenisiert und nach der Entnahme von 100 µl Homogenat mit 580 xg zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und für 10 Minuten durchgeführt. Nach Abnahme der Fettüberstände an der Innenwand des Zentrifugenröhrchens der Leber-Probe, konnte das Pellet verworfen werden, da sich die Mitochondrien im Überstand befanden. Im Überstand der Herz- und Gas-Probe befanden sich zu diesem Zeitpunkt die SSM, welche durch Mullbinden abgegossen wurden. Im Pellet befanden sich u. a. die IFM, welche erneut mit CP2 resuspendiert und zentrifugiert wurden. Nach erneutem Abgießen dieser Überstände in die schon vorhandenen SSM-Röhrchen wurden die IFM aus den Mitochondrien freigesetzt. Dies erfolgte mittels zehnminütiger Inkubation der in CP1 suspendierten Proben mit ebenfalls in CP1 gelöstem Trypsin (5 mg/ml) - einer Protease, welche die Fibrillen der Muskulatur zerstört und so die IFM zugänglich macht. Durch die Zugabe von CP2 (mit BSA) im Überschuss wurde die Reaktion des Trypsins mit anderen Proteinen in der Probe unwahrscheinlich und die Proben wurden ein letztes Mal bei 580 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Mullbinden in entsprechende IFM-Röhrchen gefüllt, während die Pellets nun verworfen wurden.

Alle Überstände (Herz SSM und IFM, Gas SSM und IFM, Leber SSM) wurden nun bei 5900 xg zentrifugiert und die Pellets im Anschluss in einer geringeren Menge CP2 (5 ml/g verwendetes Organ) resuspendiert. Die Lebermitochondrien wurden mit einem Waschpuffer, der 1mg/ml BSA enthielt, vermengt, worauf eine erneute Zentrifugation aller Proben bei 5900 xg folgte. Im nächsten Schritt wurden alle Mitochondrienpellets in wiederum weniger (2,5 ml/g verwendetes Organ) KME gelöst. Nach der darauffolgenden letzten Zentrifugation bei 5900 xg wurden die fertig isolierten Mitochondrien in 0,3 ml KME-Puffer pro g verwendetes Organ pipettiert, gewogen und auf Eis gelagert.

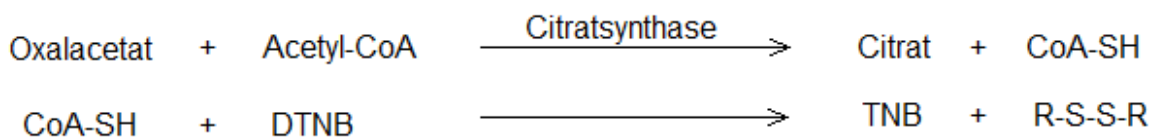


**Abbildung 3** - Übersicht des Protokolls der Mitochondrienisolation als Flussdiagramm

### 5.5.3 Messung der Citratsynthaseaktivität

Die Citratsynthaseaktivität wurde photometrisch mit dem Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader von Biotek mit dem Farbstoff DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) gemessen.

Bei der durch die Citratsynthase katalysierten Reaktion, welche in Abbildung 4 dargestellt ist, werden Thiol-Gruppen frei, welche dann stöchiometrisch mit DTNB zu 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) reagieren. Dieses wird im Reaktionsgemisch durch Deprotonierung gelb und lässt sich bei  $\lambda = 412 \text{ nm}$  nachweisen und quantifizieren.



**Abbildung 4** - Reaktionsprinzip des Citratsynthase-Assays

Für die Messung wurden die isolierten Mitochondrien und Homogenate in KEA verdünnt (Herz HOM 1:20; Herz IFM und SSM 1:60, Gas und Leber HOM 1:10, Gas IFM, SSM und Leber SSM 1:20). Es wurden dabei immer 10  $\mu\text{l}$  Mitochondrien eingesetzt. 20  $\mu\text{l}$  dieser Lösungen wurden jeweils zu 20  $\mu\text{l}$  0,9 % NaCl und zu 20  $\mu\text{l}$  Triton-X gegeben und 5 Minuten inkubiert. Triton-X löst die mitochondrialen Membranen auf (Gurtubay et al. 1980), so dass die Citratsynthase aus der mitochondrialen Matrix frei wird und die Aktivität der gesamten Citratsynthase gemessen werden kann. Die freie Aktivität wurde demnach in NaCl bestimmt. 10  $\mu\text{l}$  der so inkubierten Proben wurden für eine Doppelbestimmung in die Löcher einer 96-Loch-Platte vorgelegt und 180  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch (Tab. 8) mit einer Mehrkanalpipette dazugegeben.

**Tabelle 8** – Pipettierschema Citratsynthase-Assay

<u>Reagenz</u>	<u>Menge pro Loch [<math>\mu\text{l}</math>]</u>	
DTNB (1mM)	20	} Mastermix
Acetyl-CoA (5mM)	5	
H <sub>2</sub> O	155	
Probe (verdünnt, in 0,9 % NaCl oder Triton inkubiert)	10	



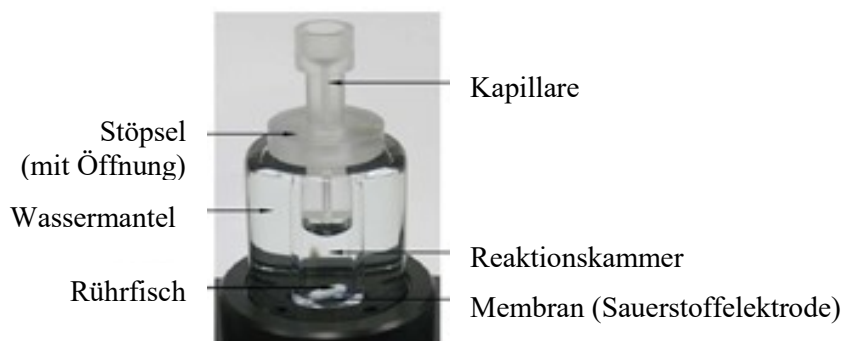
Es wurde eine erste Extinktionsaufzeichnung gestartet, um die Aktivität sonstiger Enzyme zu bestimmen, die zu unspezifischer Hydrolyse des Acetyl-CoA führen. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l Oxalacetat pro Loch wurde rasch erneut der Extinktionsanstieg bestimmt und so die Summe aus Citratsynthaseaktivität und unspezifischer Enzymaktivität ermittelt. In einem dritten Leseschritt wurde die Schichtdicke gemessen. Die Citratsynthaseaktivität wurde in Unit/ml (Menge Enzym im Homogenat oder Mitochondrienprobe, die ein  $\mu$ mol Acetyl-CoA umsetzt) gemessen.

### 5.5.4 Messung der respiratorischen Kapazität

#### *Aufbau der Messapparatur*

Die respiratorische Kapazität der isolierten Mitochondrien wurde polarographisch mit Sauerstoff-Elektroden von Strathkelvin gemessen. Das Prinzip der Messung beruht auf der Reduktion von Sauerstoff an einer Platin-Kathode zu Wasser. Die Gegenelektrode stellt eine Silber-Anode dar, welche die Elektronen für die Reaktion liefert. Bei einer angelegten Spannung von 0,4-0,8 V entsteht ein Stromfluss, der dem Partialdruck des Sauerstoffs und somit dem Sauerstoffverbrauch in der Reaktionskammer direkt proportional ist.

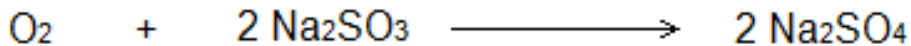
Die Elektrode war durch eine sauerstoffdurchlässige Membran von der Reaktionskammer getrennt (Abb. 5). In der Reaktionskammer befanden sich das Respirationsgemisch und die zu untersuchenden Mitochondrien. Durch den Stöpsel auf der Kammer wurde die Messung nicht durch den atmosphärischen Sauerstoff beeinflusst. Das umgebende Wasser wurde konstant auf 25 °C erwärmt und der Magnetrührfisch in der Kammer sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien, der Substrate und des Sauerstoffes in der Kammer.



**Abbildung 5** - Aufbau der Atmungskammer

### ***Kalibrierung 1***

Eine Kalibrierung mit oxygeniertem Wasser erfolgte nach jedem Membranwechsel an der Sauerstoffelektrode. Dazu wurde das Wasser durch 20-minütiges, starkes Rühren mit einem Magnetrührfisch in einem kleinen Becherglas mit Raumluft gemischt. Außerdem wurde eine Nulllösung benötigt, die mit Natriumsulfit, welches den Sauerstoff in der Lösung reduziert, hergestellt wurde (Abb. 6).



**Abbildung 6** - Reaktionsgleichung in der Nulllösung

### ***Kalibrierung 2***

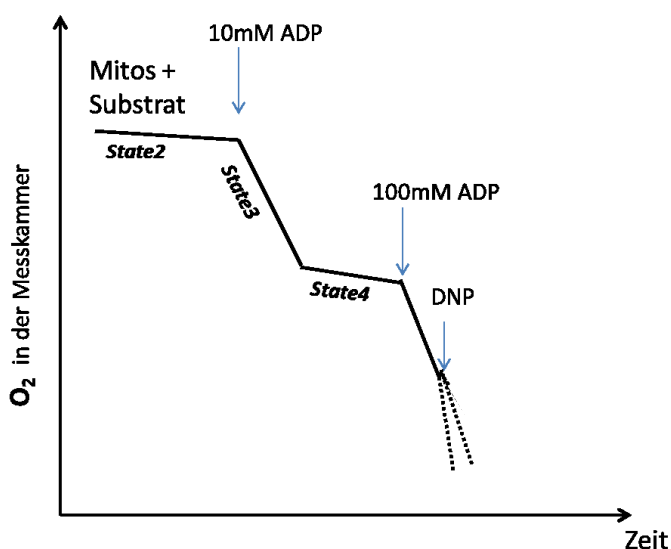
An jedem Versuchstag wurden die Elektroden mit 2 mM NADH kalibriert. Die Extinktion eines jeden NADH Aliquoten wurde bei 340 nm mit dem Photometer am Versuchstag bestimmt (950 µl destilliertes Wasser mit 50 µl NADH). Für diese Kalibrierung wurden 50 µl Mitochondrien und 950 µl Respirationsgemisch in die Messkammer gegeben. Nach kurzer Latenzzeit, in der die Ruheatmung der Mitochondrien abgebildet wurde, wurden die ersten 25 µl NADH hinzu pipettiert. Auf diese Zugabe folgte eine kurze Periode sehr hohen Sauerstoffverbrauchs. Sobald das NADH aufgebraucht war, ging der Sauerstoffverbrauch abrupt zurück und es war ein erneutes Plateau zu sehen. Es folgten weitere zwei bis vier Zugaben von NADH und eine jeweilige Stufenbildung in der Sauerstoffkurve. Aus dem Mittelwert der Sauerstoffdifferenzen vor und nach jeder NADH-Zugabe wurde ermittelt, wie hoch der Sauerstoffverbrauch bei Zugabe einer definierten NADH-Menge war. Dieser Kalibrierwert wurde in die Auswertung der Kurven einbezogen.

### ***Versuchsablauf***

Chance und Williams definierten fünf Zustände der Atmung (Chance und Williams 1955). Der Zustand der maximalen respiratorischen Rate ist definiert als State 3, es sind dabei Mitochondrien, ADP und Substrat in der Kammer. Dieser Zustand wird limitiert durch die Aktivität der Atmungskettenkomplexe und endet, wenn das ADP aufgebraucht beziehungsweise komplett zu ATP umgesetzt ist.

Für die einzelnen Messungen der maximalen respiratorischen Kapazität wurde die Menge an Mitochondrien verwendet, die 1 U Citratsynthaseaktivität hatten. Von den Lebermitochondrien

rien wurden grundsätzlich nur 0,5 U verwendet, ebenso von den Herz SSM bei geringer Ausbeute. Das Gesamtvolumen in der Atmungskammer betrug 1 ml, wovon der Anteil an Respirationsgemisch nach mehrmaligem Spülen der Kammer vorgelegt wurde. Nun wurden die Mitochondrien mittels Direktverdrängerpipette hinzugegeben und State 1 stellte sich ein, in dem die Mitochondrien nur endogene Substrate verbrauchen konnten. Darauf folgte die Zugabe des jeweiligen Substrates beziehungsweise der jeweiligen Substratkombination (Abb. 7). Der State 2 stellte sich ein, welcher durch sehr geringen Sauerstoffverbrauch wegen ADP-Mangel gekennzeichnet war. Nach Zugabe von 10 mM ADP wurde State 3 aufgezeichnet. Wenn das ADP aufgebraucht war, stellte sich ein zweiter Ruhezustand - State 4 - ein. Dieser kann auch als maximale nicht-phosphorylierende Atmung bezeichnet werden (Seifert et al. 2012) und ist abhängig von der Intaktheit der inneren Membran, der Durchlässigkeit der äußeren Membran für Protonen und dem Verlust des Protonengradienten durch Entkoppelnde Proteine (Schwarzer und Doenst 2009). Durch die folgende Zugabe von 100 mM ADP wurde ein erneuter Zustand maximaler Atmung hervorgerufen, der wegen des starken Überschusses an ADP nicht in einem State 4-ähnlichen Plateau endete. Stattdessen wurde zur Untersuchung möglicher Defekte der ATP-Synthase, des Adenin-Nukleotid-Translokators oder des Phosphat Transporters (Puchowicz et al. 2004) der Entkoppler DNP zugegeben. Dieser kann den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran abbauen, indem er die Protonen im Intermembranraum aufnimmt, durch die Membran diffundiert und sie dann in der Matrix wieder abgibt.



**Abbildung 7** - normaler Verlauf einer Atmungskurve

Um mögliche Defekte oder Veränderungen an verschiedenen Stoffwechselwegen bzw. an verschiedenen Komplexen der Atmungskette zu erkennen, ist es nötig, viele verschiedene Substrate (Tab. 9) und Substratkombinationen zu verwenden. Im Folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten Substrate und ihre Einschleusung in die Atmungskette beschrieben. Glutamat, Pyruvat beziehungsweise Palmitoyl-CoA werden über Glutamat-Dehydrogenase, Pyruvat-Dehydrogenase beziehungsweise  $\beta$ -Oxidation in den Citratzyklus eingeschleust und es entsteht  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , was in der Atmungskette dann von Komplex I oxidiert wird. Succinat wird direkt an Komplex II zu Fumarat oxidiert, so dass die Elektronenübertragung von Komplex II bis IV abläuft. Rotenon ist ein Hemmer des Komplex I, so dass bei der Zugabe von Succinat und Rotenon auch der Elektronenrückfluss von Komplex III zu I gehemmt wird und nur die Elektronenübertragung ab Komplex II gemessen werden kann. 2,4-Dinitrophenol (DNP) ist ein Entkoppler, der die Bildung eines Protonengradienten verhindert. Durch Zugabe von DNP steigt der Sauerstoffverbrauch rapide, ohne dass ATP produziert werden kann (Tohkin et al. 1988). Die Energie aus dem Gradienten geht dann als Wärme verloren (Pchelenko 1978). TMPD wirkt als Elektronendonator, welcher zwei Elektronen in Einzelschritten an Cytochrom C abgeben kann. Cytochrom C wird dann in Komplex IV oxidiert. DHQ ist ein Elektronendonator, der Elektronen an Komplex III überträgt. Azide hemmen den Komplex IV und durch ihre Zugabe zu TMPD kann der Sauerstoffverbrauch, der unabhängig von der Atmungskette ist, gemessen werden.

**Tabelle 9** - Pipettierschema der verwendeten Substrate

<b>Substrat(-kombination)</b>	<b>1.Zugabe</b>	<b>2.Zugabe ADP (10 mM)</b>	<b>3.Zugabe ADP (100 mM)</b>	<b>4.Zugabe DNP</b>
Glutamat	10 $\mu\text{l}$ Glutamat (1M)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Glutamat/Malat	10 $\mu\text{l}$ Glutamat (1 M) 5 $\mu\text{l}$ Malat (0,5 M)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Pyruvat/Malat	10 $\mu\text{l}$ Pyruvat (1 M) 5 $\mu\text{l}$ Malat (0,5 mM)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Palmitoylcarnitin/Malat	10 $\mu\text{l}$ Palmitoylcarnitin (2 mM) 5 $\mu\text{l}$ Malat (0,5 mM)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Palmitoyl-CoA/Malat/ Carnitin	5 $\mu\text{l}$ Malat (0,5 mM) 25 $\mu\text{l}$ Carnitin (0,1 M) 5 $\mu\text{l}$ Palmitoyl-CoA (2 mM)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Succinat/Rotenon	5 $\mu\text{l}$ Rotenon (0,75 mM) 10 $\mu\text{l}$ Succinat (1 M)	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
DHQ/Rotenon	5 $\mu\text{l}$ Rotenon (0,75 mM) 10 $\mu\text{l}$ DHQ (50 mM)	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
				<b>Na-Azid</b>
TMPD/Na-Azid	5 $\mu\text{l}$ Rotenon (0,75 mM) 20 $\mu\text{l}$ TMPD (25 mM)	---	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$

Es wurde der ADP:O-Quotient berechnet, der ein Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung ist (Ascensao et al. 2005). Er wird aus der Menge ATP, die pro reduziertem Sauerstoffatom produziert wird, kalkuliert (Hinkle 2005).

### **5.5.5 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde photometrisch mit dem Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader von Biotek nach dem Verfahren von Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Der verwendete Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau (aus dem Protein Assay Dye Reagent Concentrate) hat in freier Form ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, nach Proteinbindung liegt es bei 595 nm. Diese erfolgt durch die Komplexbildung mit basischen und aromatischen Seitenketten, vor allem an Argininresten, der Proteine in der Probe.

Die Proben wurden mit destilliertem Wasser verdünnt (Homogenat 1:20, Leber SSM, IFM 1:50, Gas und Herz IFM, SSM 1:40). Hierbei wurden immer 5 µl der isolierten Mitochondrien beziehungsweise des Homogenats eingesetzt. Um die Zerstörung der Mitochondrien durch zu hohe Scherkräfte zu vermeiden, wurden diese mit Direktverdrängerpipetten entnommen. Die Kalibrierkurve, aus der die Proteinwerte abgelesen werden konnten, wurde mit verdünntem BSA (0; 0,2; 0,6; 0,8 und 1 mg/ml) erstellt, wobei alles in Dreifachbestimmung pipettiert und gemessen wurde. Pro Loch einer 96-Loch-Platte wurden 200 µl 1:5 verdünntes Färbereagens und 5 µl entsprechend verdünnte Mitochondrien pipettiert und die Absorption gemessen.

### **5.5.6 Durchflusszytometrie**

Die relative Mitochondriengröße und –komplexität wurde mittels eines Durchflusszytometers der Firma Becton Dickinson gemessen. In einem Durchflusszytometer entsteht Vorwärts- (entlang des einfallenden Lichts gemessen) beziehungsweise Seitwärtsstreulicht (im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen), welche ein Maß für relative Größe (Herzenberg et al. 2002) und Volumen beziehungsweise relative Komplexität und Granularität sind (Schwarzer et al. 2013). Für die Messung wurden die isolierten Mitochondrien 1:100 verdünnt. Es wurden immer 20.000 Partikel aus einer Probe untersucht.

## 5.6 Statistische Methoden

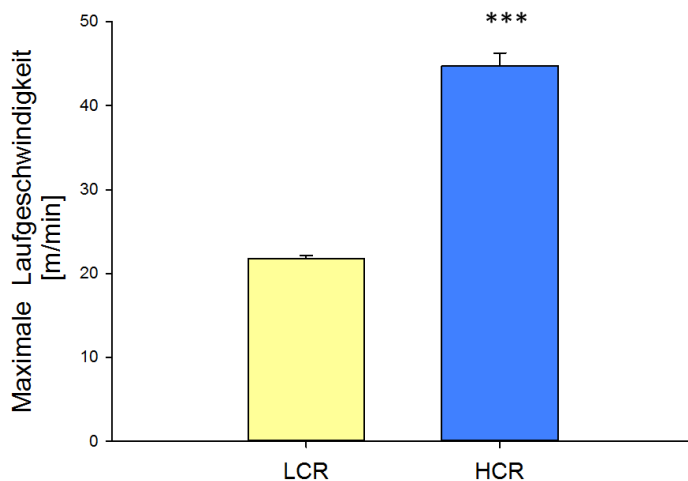
Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Zur Auswertung und zur Erstellung der Diagramme wurde das Programm SigmaPlot 13.0 verwendet und zur Signifikanzanalyse wurden two-way ANOVA und t-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgesetzt. Falls  $p < 0,05$  war, wurde dies mit \* gekennzeichnet, bei  $p < 0,01$  beziehungsweise  $p < 0,001$  wurde \*\* beziehungsweise \*\*\* verwendet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Basale Unterschiede von HCR und LCR

#### 6.1.1 Vergleich der Lauftests

Abbildung 8 zeigt den Mittelwert aus den Maximalgeschwindigkeiten aus dem jeweils schnellsten der drei Kapazitätstests. Die Tests haben die Tiere vor Beginn des Trainings absolviert. Somit konnte das darauffolgende aerobe Intervalltraining an die individuelle Leistung jedes Tieres angepasst werden. Die maximale Geschwindigkeit, welche vor Beginn des Trainings gelaufen werden konnte, sowie die mittlere Geschwindigkeit waren bei den HCR doppelt so hoch wie bei den LCR.



**Abbildung 8** - maximale Laufgeschwindigkeit im untrainierten Zustand (Kontrolltiere)  
Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

HCR und LCR konnten das Training gleich gut absolvieren. Die HCR bzw. LCR liefen beide im Schnitt nur an  $3,1 \pm 1,3$  bzw.  $3,3 \pm 0,8$  von 20 Tagen nicht die kompletten 105 Minuten in der individuellen Geschwindigkeit durch.

#### 6.1.2 Basale Unterschiede der Morphometrie

In Tabelle 10 ist zu erkennen, dass die Tiere aus allen vier Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt der Messung gleich alt und gleich groß waren. Der Altersdurchschnitt aller Tiere betrug 107 Tage, also rund 15 Wochen.

**Tabelle 10** - Alter und Tibialänge der HCR und LCR

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
Alter (d)	107 ± 1	108 ± 2	106 ± 2	109 ± 1
Tibialänge (mm)	34,8 ± 0,5	35,1 ± 0,3	34,2 ± 0,4	34,5 ± 0,2

Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. <sup>a</sup> p<0,05; <sup>aa</sup> p<0,005; <sup>aaa</sup> p<0,001 vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup> p<0,05; <sup>bb</sup> p<0,005; <sup>bbb</sup> p<0,001 vs. Kontrolle

Die LCR Kontrolltiere waren signifikant schwerer als die HCR Kontrolltiere, wie in Tabelle 11 gezeigt ist. Außerdem unterschieden sich die Tiere im auf das Körpergewicht bezogenen Herzgewicht. Dieser Quotient ist bei den HCR-Kontrolltieren größer als bei den LCR-Kontrolltieren, sie hatten also ein höheres relatives Herzgewicht. Die anderen untersuchten Organe, also Leber, Lunge, M. gastrocnemius und M. soleus unterschieden sich im Gewicht bezogen auf das Körpergewicht nicht.

**Tabelle 11** - Körper- und Organgewichte der HCR und LCR

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
KG (g)	213 ± 6	204 ± 7	179 ± 3 <sup>aaa</sup>	204 ± 7 <sup>bb</sup>
HG (mg)	603 ± 17	639 ± 23	590 ± 11	703 ± 20 <sup>a bb</sup>
HG/KG (mg/g)	2,83 ± 0,03	3,14 ± 0,06 <sup>bb</sup>	3,30 ± 0,06 <sup>aaa</sup>	3,47 ± 0,07 <sup>aa b</sup>
GasG (mg)	2723 ± 122	2780 ± 87	2394 ± 70 <sup>a</sup>	2669 ± 77 <sup>b</sup>
GasG/KG (mg/g)	12,8 ± 0,45	13,7 ± 0,25	13,4 ± 0,31	13,2 ± 0,20
LG (mg)	7315 ± 317	7321 ± 398	6217 ± 105 <sup>aa</sup>	8062 ± 349 <sup>bbb</sup>
LG/KG (mg/g)	34,2 ± 0,86	35,8 ± 0,85	34,8 ± 0,46	39,8 ± 1,45
SolG (mg)	163 ± 7	170 ± 6	145 ± 7	194 ± 10 <sup>bbb</sup>
SolG/KG (mg/g)	0,76 ± 0,02	0,84 ± 0,05	0,80 ± 0,03	0,95 ± 0,03 <sup>a bbb</sup>
LuG (mg)	900 ± 23	922 ± 42	855 ± 9	886 ± 77
LuG/KG (mg/g)	4,23 ± 0,05	4,53 ± 0,20	4,81 ± 0,11	4,41 ± 0,39

Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. KG - Körpergewicht; HG - Herzgewicht; GasG - Gewicht M. gastrocnemius; LG - Lebergewicht; SolG - Gewicht M. soleus; LuG - Lungengewicht.

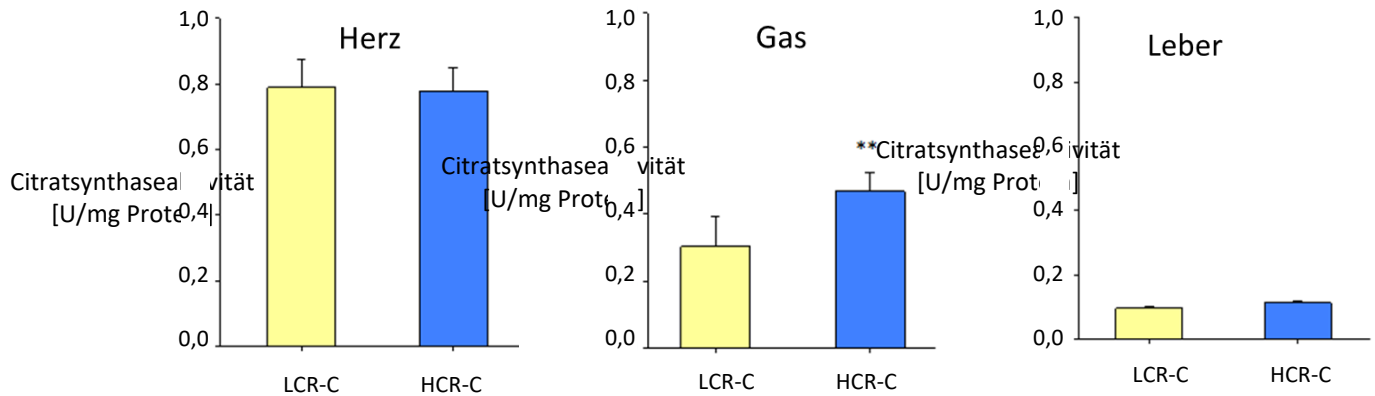
<sup>a</sup> p<0,05; <sup>aa</sup> p<0,005; <sup>aaa</sup> p<0,001 vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup> p<0,05; <sup>bb</sup> p<0,005; <sup>bbb</sup> p<0,001 vs. Kontrolle

### 6.1.3 Basale Unterschiede der Mitochondrien

Die Citratsynthaseaktivitäten der Kontrolltiere von Herz, Leber und M. gastrocnemius sind in Abbildung 9 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Citratsynthaseaktivität bezogen auf ein Milligramm aller enthaltenen Proteine sich lediglich im untersuchten Skelettmuskel wesentlich

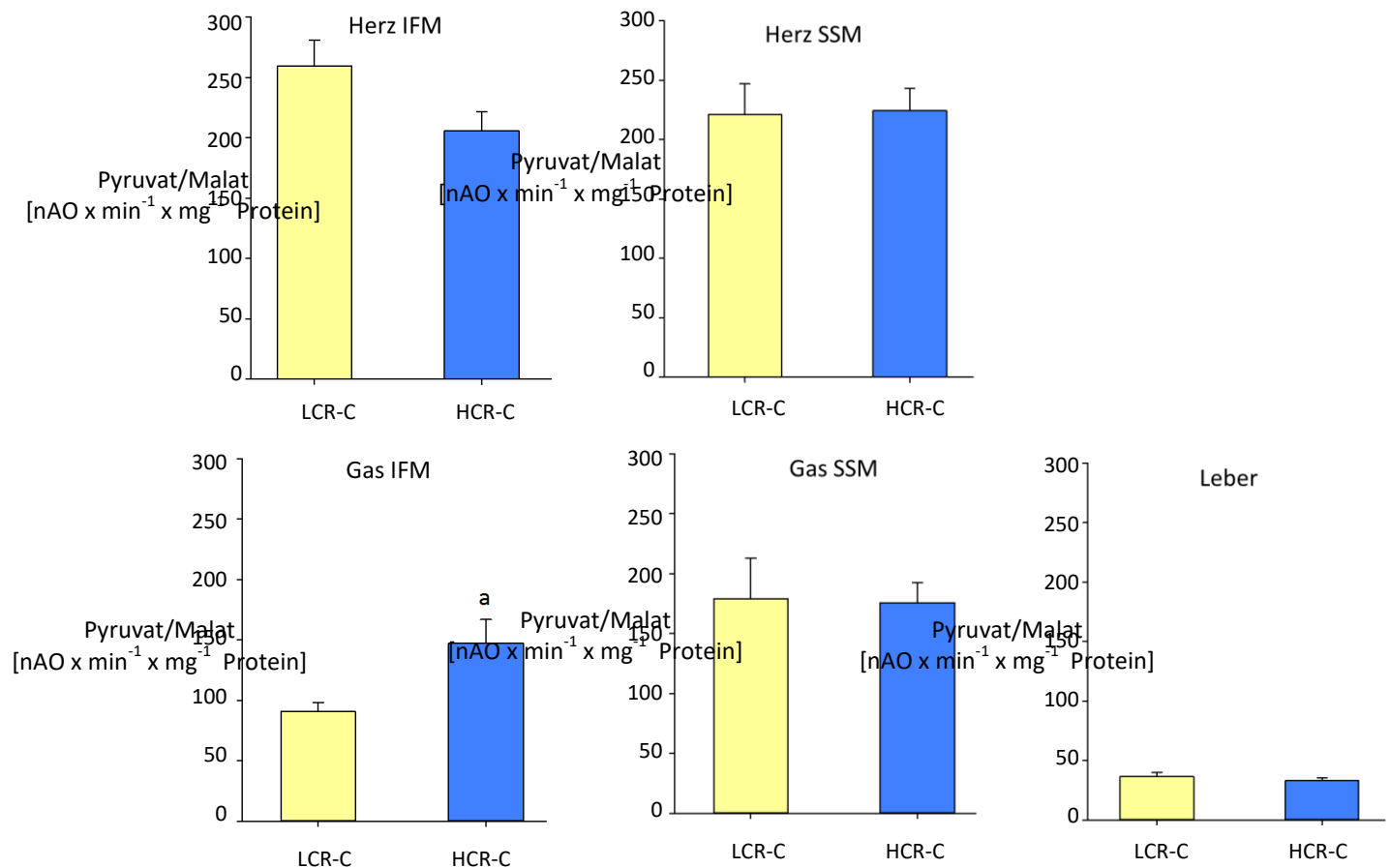


unterscheidet. Sie war hier in den HCR höher als in den LCR. Eine hohe Citratsynthaseaktivität korreliert mit einem hohen mitochondrialen Gehalt (Larsen et al. 2012).



**Abbildung 9-** Citratsynthaseaktivität der Mitochondrien der Kontrolltiere in Herz, M. gastrocnemius und Leber. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrollen; Gas - M. gastrocnemius. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Abbildung 10 zeigt die Unterschiede der respiratorischen Kapazität der Kontrolltiere in Herz IFM, Herz SSM, Gas IFM und Gas SSM. Dargestellt ist die maximale respiratorische Kapazität der Mitochondrien exemplarisch mit dem Substrat Pyruvat/Malat. Im Herzen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den maximalen respiratorischen Kapazitäten der untrainierten HCR und LCR. Im M. gastrocnemius ist zu erkennen, dass in den interfibrillären Mitochondrien die HCR eine höhere maximale respiratorische Kapazität hatten als die LCR. Die maximalen respiratorischen Kapazitäten der Gas SSM scheinen hingegen unabhängig vom Phänotyp zu sein. Diese Beobachtungen lassen sich auch mit den anderen untersuchten Substraten zeigen (Abb. 11, 12, 13 und 14). Die respiratorischen Kapazitäten der Mitochondrien von untrainierten HCR und LCR in der Leber unterschieden sich nicht (Tab. 14).

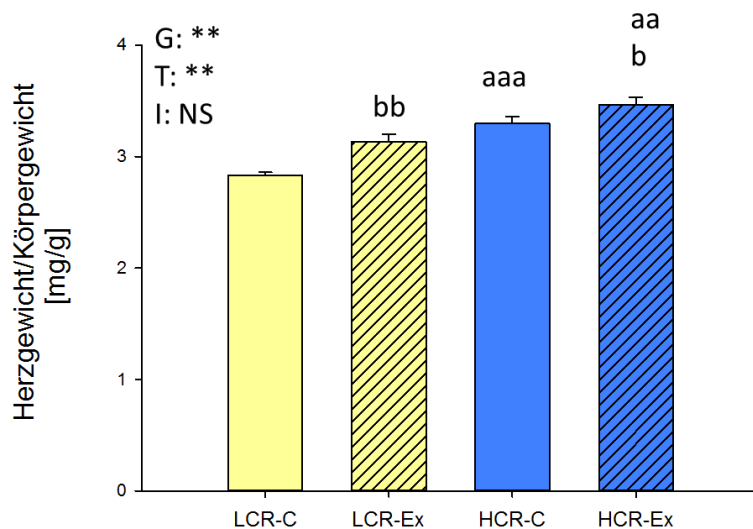


**Abbildung 10** - Maximale respiratorische Kapazitäten (State 3) der Mitochondrien der untrainierten Tiere (Kontrolle) in Herz, M. gastrocnemius und Leber mit Pyruvat/Malat. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrollen; Gas - M. gastrocnemius. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 6.2 Effekte von Ausdauertraining

### 6.2.1 Effekte auf die Morphometrie

In Tabelle 11 ist dargestellt, dass die trainierten HCR signifikant schwerer waren als die gleich alten Kontrolltiere, während die trainierten LCR nach dem Training tendenziell weniger wogen als die untrainierten LCR im selben Alter. Nach dem vierwöchigen aeroben Intervalltraining hatten die trainierten Tiere größere relative Herzgewichte als die untrainierten Tiere desselben Alters. Abbildung 11 veranschaulicht dieses Zeichen für kardiale Hypertrophie. Dies zeigt den Einfluss von Genetik und Training auf das Herzgewicht.



**Abbildung 11** - relatives Herzgewicht von untrainierten und trainierten HCR und LCR. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrolle; Ex - Trainiert; NS - nicht signifikant; G - Genetik; T - Training; I - Interaktion. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist, hatte das Training bei den LCR keinen Einfluss auf weitere Organgewichte. Bei den HCR hingegen war das relative Gewicht des M. soleus, einem roten Typ I Muskel (Seifert et al. 2012), bei den trainierten HCR signifikant größer als bei den untrainierten HCR. Auch das Lebergewicht war bei den trainierten HCR höher als bei den Untrainierten.

## 6.2.2 Effekte auf die Mitochondrien

### *Effekte auf die relative Größe und Komplexität der Mitochondrien*

In Tabelle 12 sind Vorwärtsstreulicht als relatives Maß für die Größe der Mitochondrien und Seitwärtsstreulicht als relatives Maß für die Komplexität der Mitochondrien aufgeführt. Gemessen wurden diese mittels Durchflusszytometrie. Es ist zu erkennen, dass die Mitochondrien der untrainierten LCR und HCR sich in ihrer relativen Größe und Komplexität nicht unterscheiden. Es ist außerdem kein Unterschied zwischen den Tieren, welche das aerobe Intervalltraining absolvierten, und den untrainierten Tieren sichtbar.

**Tabelle 12** - Relative Größe und Komplexität der Mitochondrien

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
<b>Relative Größe</b>				
Herz IFM	10,8 ± 0,20	11,0 ± 0,23	11,2 ± 0,28	10,9 ± 0,51
Herz SSM	11,0 ± 0,36	11,9 ± 0,33	11,8 ± 0,55	11,5 ± 0,33
Gas IFM	8,00 ± 0,18	8,12 ± 0,19	7,69 ± 0,22	7,20 ± 0,11 <sup>aa</sup>
Gas SSM	10,5 ± 0,60	9,98 ± 0,50	10,4 ± 0,61	9,66 ± 0,66
Leber Mitochondrien	19,4 ± 1,46	18,1 ± 1,11	20,4 ± 1,08	17,4 ± 1,21
<b>Relative Komplexität</b>				
Herz IFM	1,33 ± 0,04	1,29 ± 0,04	1,33 ± 0,03	1,29 ± 0,03
Herz SSM	1,53 ± 0,04	1,63 ± 0,05	1,55 ± 0,06	1,45 ± 0,06
Gas IFM	1,23 ± 0,05	1,15 ± 0,01	1,22 ± 0,04	1,14 ± 0,02
Gas SSM	1,61 ± 0,08	1,57 ± 0,08	1,65 ± 0,09	1,48 ± 0,09
Leber Mitochondrien	2,17 ± 0,11	2,03 ± 0,15	2,08 ± 0,11	1,97 ± 0,13

Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. Werte sind in willkürlichen Einheiten (arbitrary units) angegeben. <sup>a</sup> p<0,05; <sup>aa</sup> p<0,005; <sup>aaa</sup> p<0,001 vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup> p<0,05; <sup>bb</sup> p<0,005; <sup>bbb</sup> p<0,001 vs. Kontrolle

### ***Effekte auf die Citratsynthaseaktivität***

Tabelle 13 zeigt die gemessenen Citratsynthaseaktivitäten aller Populationen. Bei den Herz-mitochondrien fällt auf, dass die trainierten HCR eine wesentlich größere Citratsynthaseaktivität hatten als die untrainierten HCR, dieser Unterschied ist im Homogenat und in den IFM signifikant. Diese Erhöhung der Citratsynthaseaktivität durch Training ist auch bei den LCR zu erkennen. Allerdings ist die Differenz der Aktivitäten von trainierten und untrainierten LCR im Homogenat dezenter als bei den HCR. Die Citratsynthase des Herzens der HCR scheint also durch Training stärker beeinflusst zu sein als die der LCR.

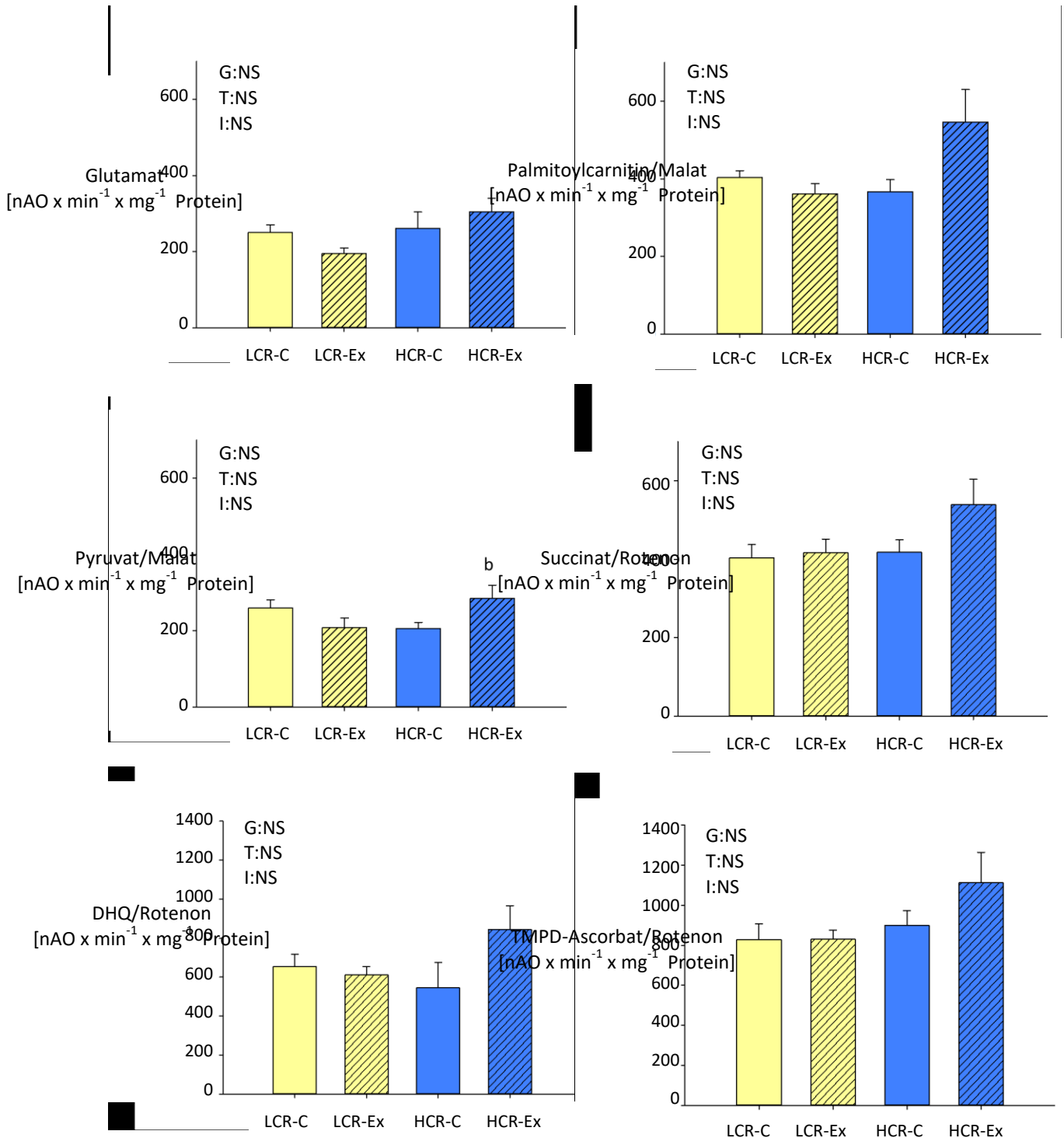
**Tabelle 13** - Citratsynthaseaktivitäten in Unit/mg Protein

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
Herz Hom	0,80 ± 0,10	1,08 ± 0,18	0,78 ± 0,07	1,58 ± 0,45 <sup>b</sup>
Herz IFM	3,10 ± 0,18	2,50 ± 0,40	2,94 ± 0,28	4,18 ± 0,46 <sup>aa b</sup>
Herz SSM	4,12 ± 0,84	3,79 ± 0,58	2,84 ± 0,24	4,79 ± 0,63
Gas Hom	0,30 ± 0,09	0,56 ± 0,18	0,47 ± 0,05	0,65 ± 0,05
Gas IFM	1,12 ± 0,10	1,55 ± 0,19	1,94 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,59 ± 0,37 <sup>a</sup>
Gas SSM	2,15 ± 0,30	3,59 ± 1,21	3,09 ± 0,46	3,25 ± 0,37
Leber Hom	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Leber Mitochondrien	0,42 ± 0,04	0,52 ± 0,14	0,40 ± 0,02	0,46 ± 0,07

Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. Hom - Homogenat; Gas - M. gastrocnemius; <sup>a</sup> p<0,05; <sup>aa</sup> p<0,005; <sup>aaa</sup> p<0,001 vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup> p<0,05; <sup>bb</sup> p<0,005; <sup>bbb</sup> p<0,001 vs. Kontrolle

## Effekte auf die respiratorische Kapazität von Herzmitochondrien

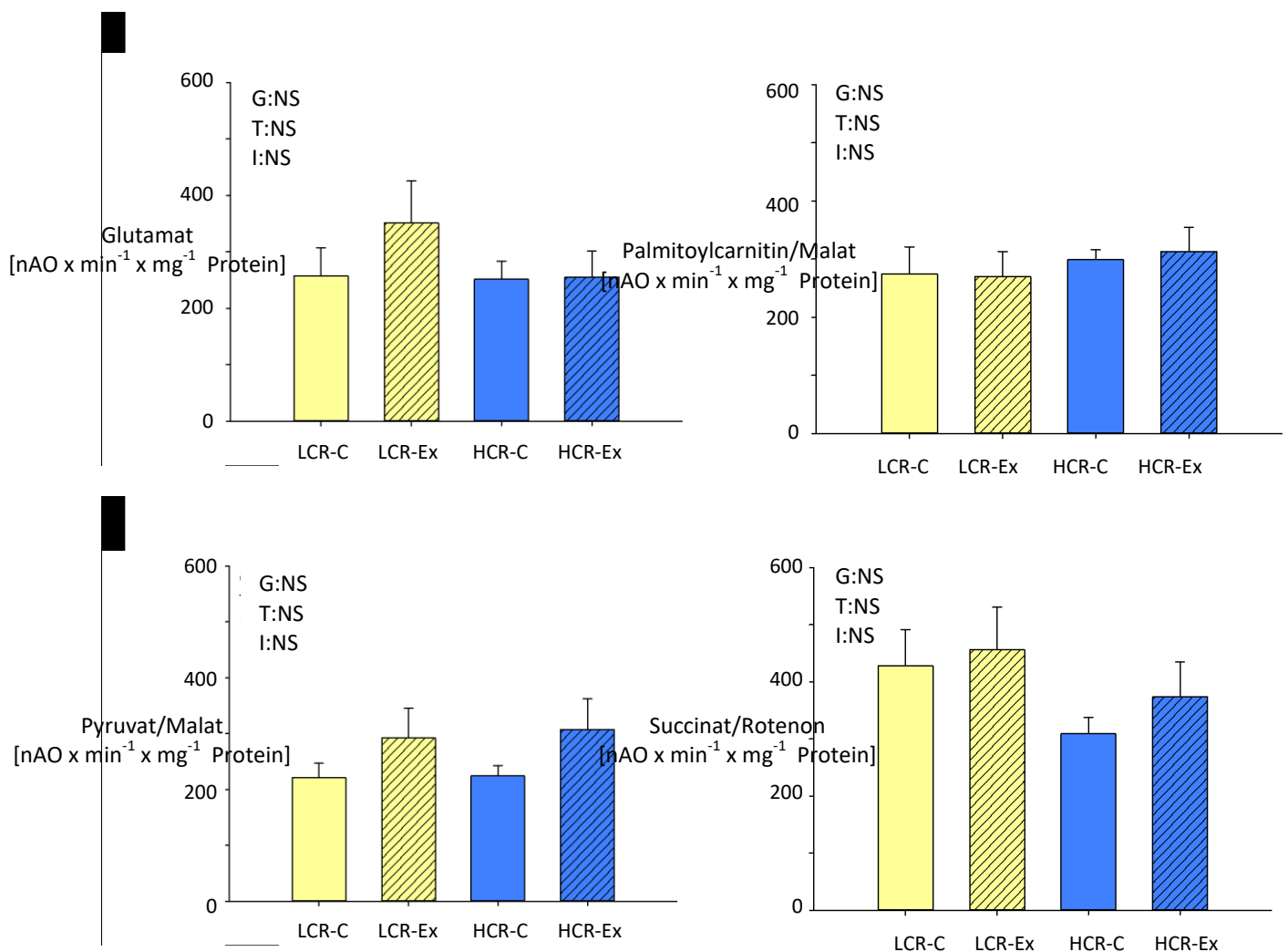
Die maximalen respiratorischen Kapazitäten der interfibrillären Mitochondrien (IFM) des Herzens sind in Abbildung 12 gezeigt.

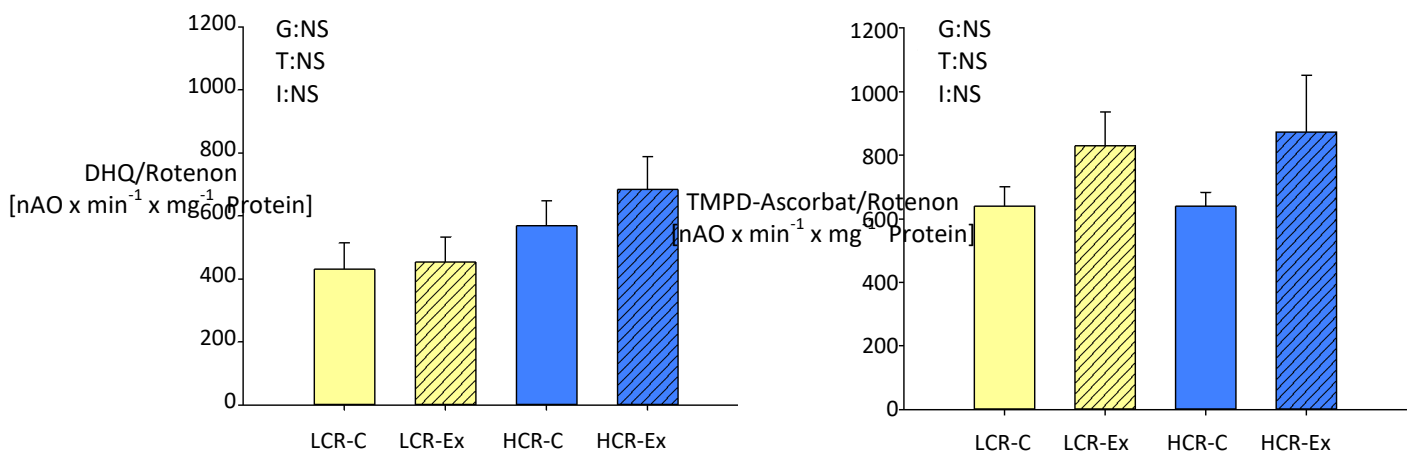


**Abbildung 12** - Herz IFM - maximale respiratorische Kapazität (State 3). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrolle; Ex - Trainiert; NS - nicht signifikant; G - Genetik; T - Training; I - Interaktion. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

Es ist deutlich zu sehen, dass die trainierten HCR höhere maximale respiratorische Kapazitäten als die untrainierten HCR hatten. Die trainierten LCR hatten gleich hohe oder sogar niedrigere maximale respiratorische Kapazitäten als die untrainierten LCR. Dies ist bei allen verwendeten Substraten zu beobachten. Bei den IFM ist also ein deutlicher Einfluss der genetischen Prädisposition auf den Effekt von Ausdauertraining erkennbar. So sind die maximalen respiratorischen Kapazitäten der trainierten HCR auch deutlich höher als die der trainierten LCR. Bei den untrainierten Tieren ist kein Unterschied zu erkennen.

In Abbildung 13 sind die maximalen respiratorischen Kapazitäten der subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) des Herzens gezeigt.





**Abbildung 13** - Herz SSM - maximale respiratorische Kapazität (State 3). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrolle; Ex - Trainiert; NS - nicht signifikant; G - Genetik; T - Training; I - Interaktion. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

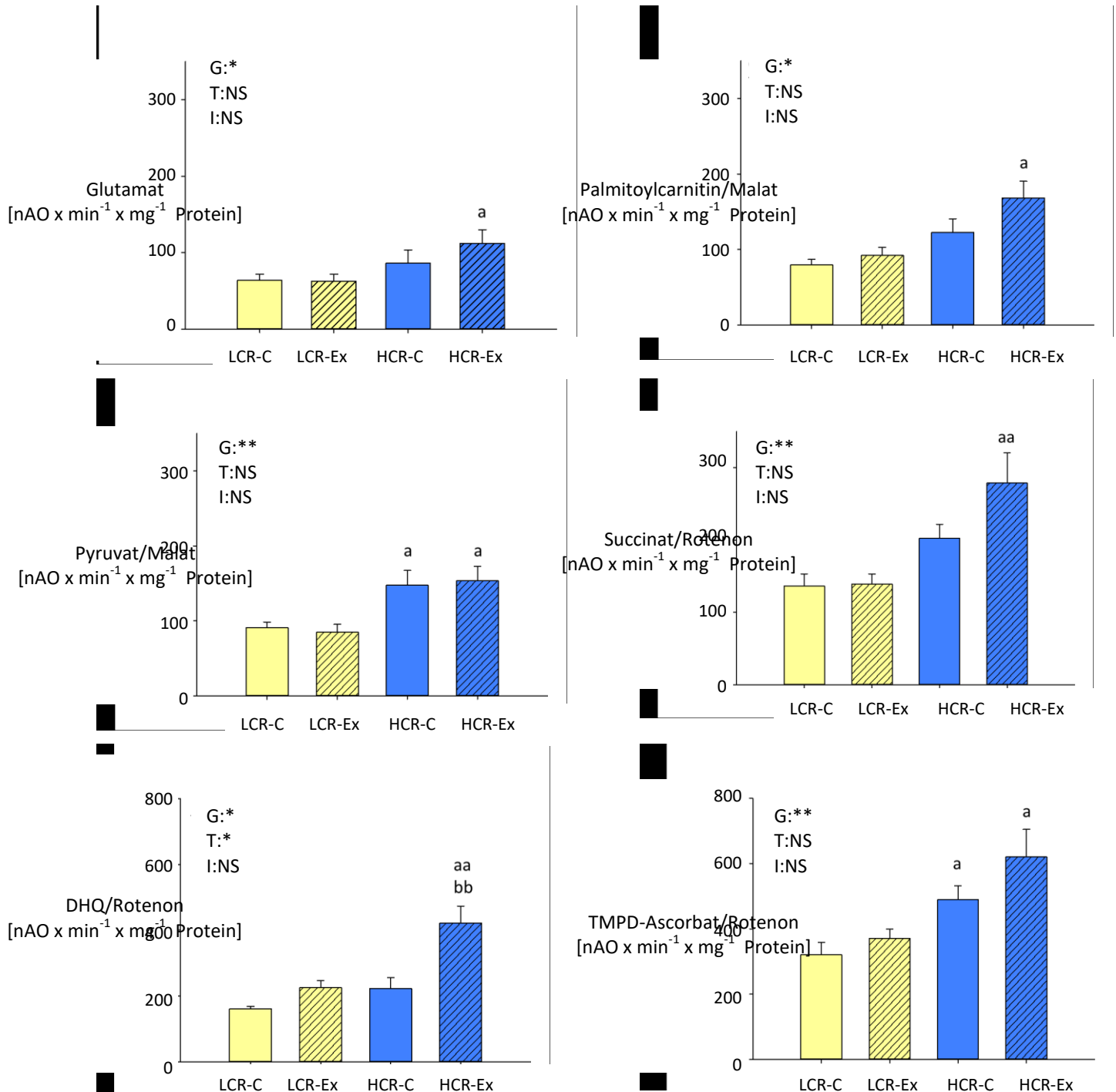
Das Ausdauertraining erhöhte die maximale respiratorische Kapazität der SSM der HCR tendenziell, dennoch scheint der Effekt von Ausdauertraining geringer ausgeprägt zu sein als auf die IFM der HCR. So war die Kapazitätserhöhung nicht mit allen Substraten zu beobachten. Mit Glutamat und Palmitoylcarnitin/Malat als Substrat wurde kein Effekt von Ausdauertraining beobachtet.

Bei den LCR scheint der Effekt von Ausdauertraining auf die SSM allerdings größer zu sein als auf die IFM. So kann man bei SSM der trainierten LCR höhere maximale respiratorische Kapazitäten erkennen als bei den untrainierten LCR. Außer mit dem untersuchten Fettsubstrat Palmitoylcarnitin/Malat konnte dies mit allen Substraten beobachtet werden, die Veränderungen waren allerdings nicht signifikant. So unterschieden sich die maximalen respiratorischen Kapazitäten der SSM der trainierten HCR und LCR nicht wesentlich voneinander.

Ausdauertraining erhöhte also bei HCR die maximale respiratorische Kapazität aller Herzmitochondrien, vor allem die der IFM. Bei LCR erhöhte Ausdauertraining nur die maximale respiratorische Kapazität der SSM des Herzens. Während die respiratorische Kapazität der IFM der trainierten HCR deutlich höher war als die der trainierten LCR, unterschieden sich die Kapazitäten der SSM aller trainierten Tiere kaum.

## Effekte auf die respiratorische Kapazität von Skelettmuskelmitochondrien

Abbildung 14 zeigt die maximalen respiratorischen Kapazitäten der IFM im M. gastrocnemius (Gas).

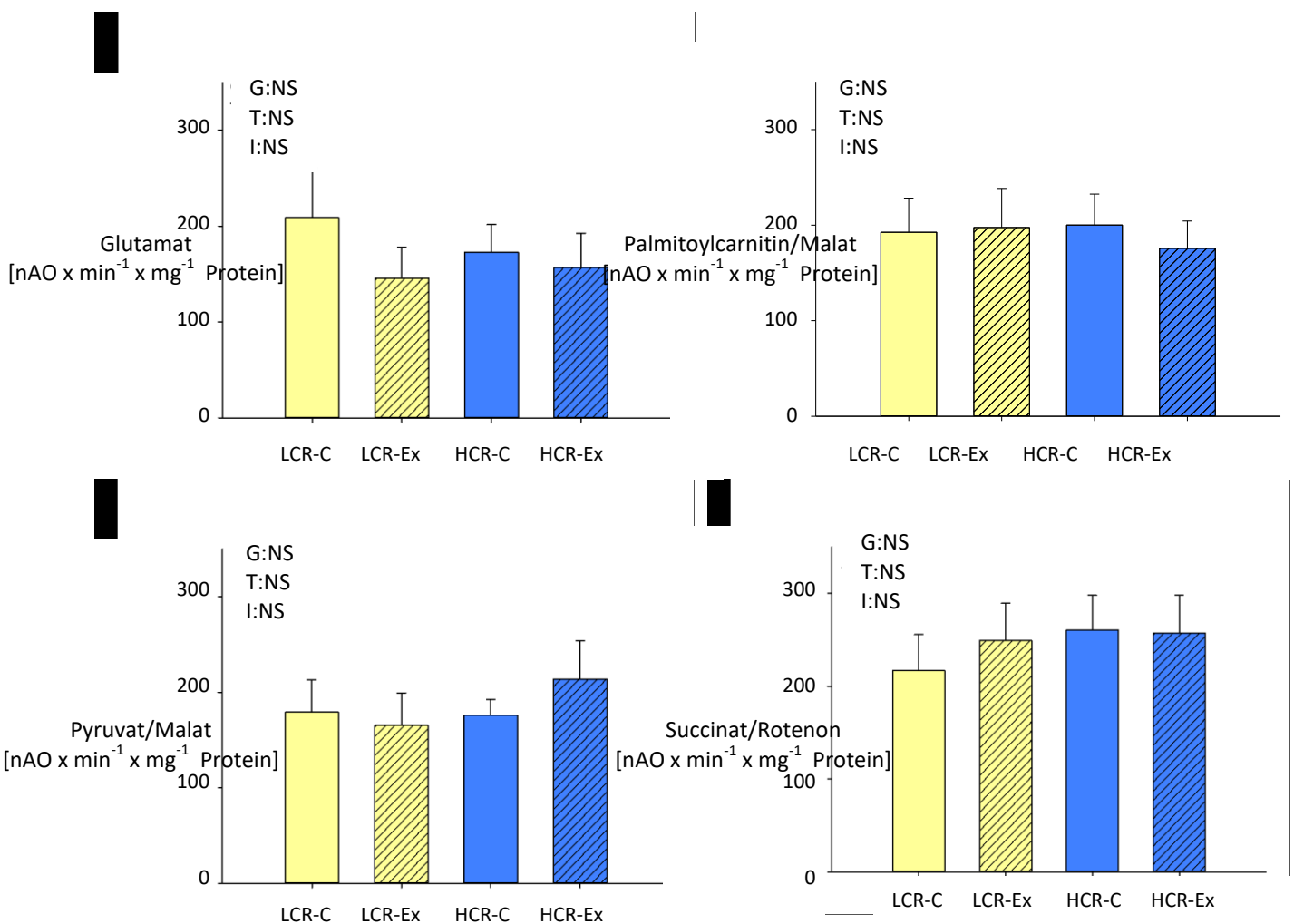


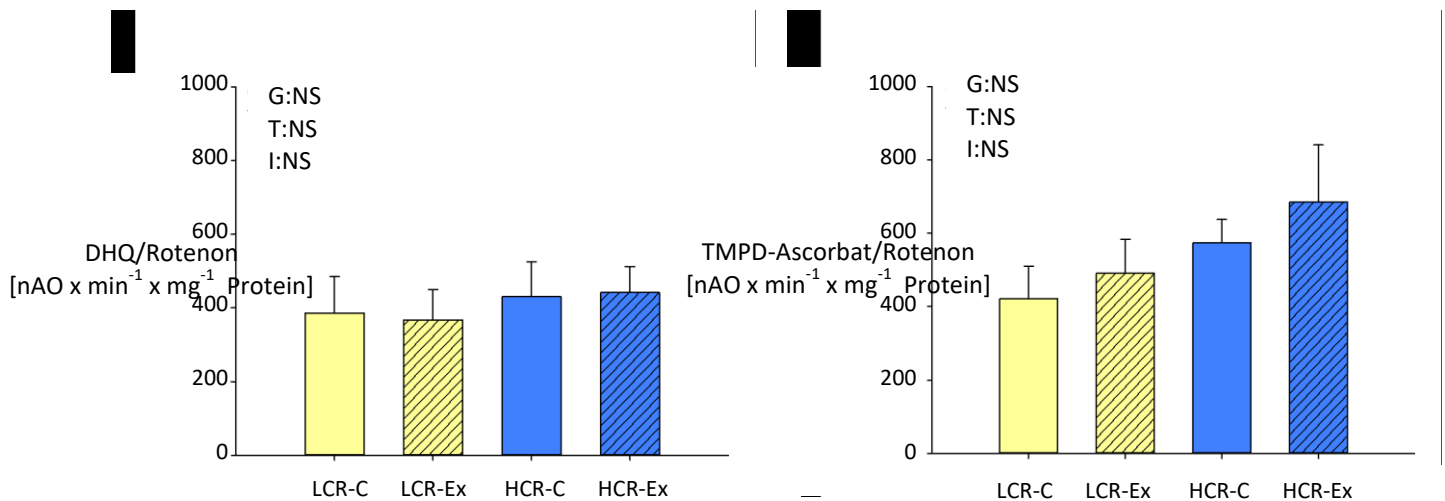
**Abbildung 14** - Gas IFM - maximale respiratorische Kapazität (State 3). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrollen; Ex - Trainiert; NS - nicht signifikant; G - Genetik; T - Training; I - Interaktion. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle



Es wurden mit allen Substraten bei trainierten HCR höhere respiratorische Kapazitäten gemessen als bei untrainierten HCR. Bei den LCR hingegen gab es keinen Unterschied zwischen den trainierten und untrainierten Tieren. Analog zu den Herz IFM ist außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen den trainierten HCR und den trainierten LCR erkennbar. Nach dem Training hatten die HCR eine nahezu doppelt so hohe maximale respiratorische Kapazität wie die LCR, so dass die Unterschiede zwischen den Populationen durch das Training noch größer wurden.

In Abbildung 15 sind die maximalen respiratorischen Kapazitäten der SSM des M. gastrocnemius abgebildet.





**Abbildung 15** - Gas SSM –maximale respiratorische Kapazität (State 3). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. C - Kontrollen; Ex - Trainiert; NS - nicht signifikant; G - Genetik; T - Training; I - Interaktion. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

Die Effekte von Ausdauertraining auf die SSM des M. gastrocnemius waren weniger ausgeprägt als die auf die IFM. Insgesamt entstand das Bild, dass Ausdauertraining nahezu keinen Effekt auf die SSM des untersuchten Skelettmuskels hatte. Außerdem war die Streubreite der respiratorischen Kapazitäten der SSM der HCR und LCR größer. Unabhängig vom Trainingszustand unterschieden sich die HCR nicht von den jeweiligen LCR.

### ***Effekte auf die respiratorische Kapazität von Lebermitochondrien***

In der Leber wurden keine Unterschiede zwischen den trainierten Tieren und den Kontrolltieren festgestellt. Es war ein Trend zu niedrigeren Werten bei den trainierten HCR und LCR im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erkennbar, welcher sich jedoch nicht mit allen Substraten zeigte. Die Werte sind in Tabelle 14 abgebildet.

**Tabelle 14** - Lebermitochondrien – maximale respiratorische Kapazität (State 3) der trainierten und untrainierten HCR und LCR

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
Glutamat	90,8 ± 3,37	73,2 ± 8,59	102 ± 2,54	77,8 ± 5,62 <sup>b</sup>
Palmitoylcarnitin/Malat	102 ± 10,5	90,8 ± 8,40	119 ± 9,06	113 ± 9,88
Pyruvat/Malat	36,3 ± 3,69	28,5 ± 4,61	33,1 ± 2,34	39,0 ± 4,66
Succinat/Rotenon	148 ± 15,5	133 ± 21,0	159 ± 12,7	147 ± 16,1
DHQ/Rotenon	144 ± 8,89	150 ± 22,2	176 ± 7,03	158 ± 15,3
TMPD/Na-Ascorbat	276 ± 29,7	291 ± 31,0	298 ± 22,8	317 ± 31,0

Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. Alle Daten in  $\text{nAO} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  Protein.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

Die ADP:O Werte dazu sind in Tabelle 15 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass bei einigen Substraten (Glutamat, Palmitoylcarnitin/Malat, Succinat/Rotenon) der ADP:O-Quotient bei den trainierten Tieren höher war als bei den Kontrollen.

**Tabelle 15** - Lebermitochondrien - ADP:O der trainierten und untrainierten HCR und LCR

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
Glutamat	3,09 ± 0,16	4,10 ± 0,46	3,35 ± 0,20	4,26 ± 0,34
Palmitoylcarnitin/Malat	2,56 ± 0,22	2,85 ± 0,31	2,79 ± 0,18	2,79 ± 0,27
Pyruvat/Malat	2,36 ± 0,19	2,46 ± 0,23	2,41 ± 0,19	2,64 ± 0,32
Succinat/Rotenon	1,57 ± 0,09	2,38 ± 0,26 <sup>bb</sup>	1,83 ± 0,14	1,98 ± 0,19
DHQ/Rotenon	1,63 ± 0,10	2,16 ± 0,24	1,55 ± 0,07	1,44 ± 0,24

Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

## 7 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Ausdauertraining auf die maximale respiratorische Kapazität von Mitochondrien untersucht. Die Mitochondrien wurden aus Herz-, Skelettmuskel und Leber von Ratten mit hoher und mit niedriger intrinsischer körperlicher Leistungsfähigkeit isoliert. Die Hauptaussagen dieser Arbeit sind:

- Eine kardiale Gewichtserhöhung durch Training ist in beiden Phänotypen zu beobachten. Eine Erhöhung des Körper-, M. soleus- und Lebergewichts wird jedoch nur bei HCR beobachtet. Folglich ändern sich die Organrelationen durch Ausdauertraining abhängig vom Phänotyp.
- Die basale Citratsynthaseaktivität sowie die Höhe der basalen maximalen respiratorischen Kapazität der IFM sind im M. gastrocnemius von HCR höher als bei den LCR. Bei Herz- und Lebermitochondrien hingegen sind die maximale respiratorische Kapazität sowie die Citratsynthaseaktivität bei beiden Phänotypen gleich. Bezogen auf die Mitochondrienfunktion unterscheiden sich untrainierte HCR und LCR demnach nur im Skelettmuskel.
- Die Citratsynthaseaktivität der Herzmitochondrien sowie die maximale respiratorische Kapazität der Herz IFM und Gas IFM erhöhen sich durch Training nur bei HCR. Der Effekt des Ausdauertrainings auf die Mitochondrienfunktion hängt bei Herz und Skelettmuskel demnach von der intrinsischen Ausdauerleistungsfähigkeit ab.

## **7.1 Basale Mitochondrienfunktion von HCR und LCR**

### **7.1.1 Citratsynthaseaktivität**

Die Citratsynthaseaktivität wird als Marker der Mitochondrienfunktion und -menge angesehen (Blomstrand et al. 1997, Larsen et al. 2012). Bei männlichen Tieren wurden im Herzgewebe von HCR und LCR keine Unterschiede der Citratsynthaseaktivität beobachtet (Johnsen et al. 2013b). DeMarco et al. hingegen untersuchten die Herzmuskeln weiblicher Tiere und stellten hier eine höhere Citratsynthaseaktivität der HCR gegenüber den LCR fest (DeMarco et al. 2012). Unsere Ergebnisse zeigen keine Unterschiede in der Citratsynthaseaktivität des Herzens und der Leber der HCR und LCR. Diese Diskrepanz der Ergebnisse könnte zum einen auf das verschiedene Geschlecht der Versuchstiere von Johnsen et al. und auf das wesentlich höhere Alter der Versuchstiere von DeMarco et al. zurückzuführen sein. Unsere Tiere waren 15 Wochen alt, während DeMarco et al. 30 Wochen alte Tiere untersuchten (DeMarco et al. 2012).

Auch beim Skelettmuskel ist die Datenlage über die Unterschiede der Citratsynthaseaktivitäten von HCR und LCR nicht eindeutig. Erhöhte mitochondriale Enzymaktivitäten bei HCR wurden im *M. gastrocnemius* (Howlett et al. 2003) und in einer Skelettmuskelmischung (Stephenson et al. 2012) gezeigt. In anderen Untersuchungen konnte kein Aktivitätsunterschied im roten Anteil des *M. gastrocnemius* (Naples et al. 2010) und einer anderen Skelettmuskelmischung (Seifert et al. 2012) nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies durch die verschiedenen Faseranteile der Skelettmuskulatur zu erklären. So wurde im weißen Anteil des *M. gastrocnemius* eine erhöhte Citratsynthaseaktivität bei den HCR identifiziert, jedoch im roten Anteil des gleichen Muskels nicht (Rivas et al. 2011). Denkbar wäre also, dass die Citratsynthaseaktivität nur in den weißen Muskelfasern (Typ II) der HCR mit sehr hoher und schneller Kraftleistung höher ist. In den roten, langsam arbeitenden (Typ I) Skelettmuskelfasern und in der gleichmäßig arbeitenden Herzmuskulatur könnte sie hingegen bei HCR und LCR gleich hoch sein. Gegen diese Hypothese spricht, dass in anderen Untersuchungen im roten *M. soleus* (Lessard et al. 2011, Stephenson et al. 2012) und im vorwiegend roten Diaphragma (Sollanek et al. 2015) ebenfalls höhere Werte der Citratsynthaseaktivität bei den HCR gemessen wurden. Eine Rolle könnte auch das unterschiedliche Verhältnis von Typ I zu Typ II Fasern bei HCR und LCR spielen. Hierzu ist die Studienlage ebenfalls uneinheitlich. Seifert et al. beschrieben eine erhöhte Typ II-Fasermenge im *M. gastrocnemius* der HCR

(Seifert et al. 2012), während Howlett et al. keine Unterschiede im Anteil von Typ I Fasern beschreiben (Howlett et al. 2003).

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass die Citratsynthaseaktivität von HCR und LCR lediglich im M. gastrocnemius voneinander abweicht. Hier wurde bei den HCR eine höhere Aktivität gemessen. Bei diesem Muskel handelt es sich um einen Muskel mit gemischten Fasertypen (Seifert et al. 2012), so dass keine Aussagen zu unterschiedlichen Fasertypen gemacht werden können.

Insgesamt waren die Citratsynthaseaktivitäten der Skelettmuskelmitochondrien der HCR in den meisten Untersuchungen höher als die der LCR. Dies wurde in beiden Muskelfasertypen beobachtet. Sowohl das Verhältnis der Fasertypen als auch die Höhe der Citratsynthaseaktivität könnten bei HCR und LCR von anderen, noch unbekannten Variablen wie zum Beispiel dem Alter abhängen. Dieses reichte beispielsweise in den genannten Untersuchungen von rund 11 Wochen (Stephenson et al. 2012) bis 60 Wochen (Seifert et al. 2012).

### **7.1.2 Größe, Komplexität und Mitochondrienmenge**

Die Mitochondrienzahl wurde im Skelettmuskel bereits elektronenmikroskopisch untersucht. Es wurden keine Unterschiede der Mitochondrienzahl von HCR und LCR im roten Anteil des M. gastrocnemius (Naples et al. 2010) oder des roten M. soleus gefunden, während HCR im weißen M. extensor digitorum longus eine höhere Anzahl hatten (Rivas et al. 2011). Auch in einer Skelettmuskelmischung mit weißen und roten Muskelfaseranteilen war der mitochondriale Gehalt in HCR um ca. 43 % größer (Seifert et al. 2012). Es wäre also möglich, dass die Mitochondrienanzahl und der mitochondriale Gehalt vom Muskelfasertyp abhängen und es nur im weißen Muskel Unterschiede zwischen den Phänotypen gibt. Unsere Daten wurden im gemischten (rot und weiß) M. gastrocnemius gemessen. Hierbei war die Citratsynthaseaktivität der HCR höher, die relative Größe und Komplexität der Mitochondrien allerdings gleich. Zusammen weist beides auf eine höhere Mitochondrienanzahl in den HCR hin. Ob diese gemessene Gesamtveränderung nur auf eine Veränderung der weißen Fasern im M. gastrocnemius zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Unsere Daten lassen weiterhin darauf schließen, dass es im Herzen und in der Leber keine Unterschiede in der Mitochondrienanzahl zwischen HCR und LCR gibt, denn die relative Größe und Komplexität sowie die Citratsynthaseaktivität waren nicht unterschiedlich.

### 7.1.3 Maximale respiratorische Kapazitäten

#### *Maximale respiratorische Kapazitäten der Herzmitochondrien*

Mitochondriale Dysfunktion trägt zur Entstehung von metabolischen Erkrankungen bei (Bournat und Brown 2010) und spielt eine Rolle bei Diabetes und Übergewicht. Die diabetische Kardiomyopathie beispielsweise wird unter anderem durch mitochondriale Dysfunktion verursacht (Boudina und Abel 2007). Auch war in Herzen von Nagern (Aasum et al. 2003) und Menschen (Ritov et al. 2010) mit Diabetes die Fettsäureverwertung niedriger und die Glukoseverwertung höher als bei Herzen von Gesunden. Außerdem haben diabetische Mäuse eine geringere metabolische Flexibilität, denn das Ausmaß der Fettoxidation war beim Fasten und bei Glukosegabe gleich (Oakes et al. 2006). Das metabolische Syndrom in LCR (Wisloff et al. 2005) deutet darauf hin, dass eine gestörte Mitochondrienfunktion mit niedrigerer Fettsäureverwertung vorliegt. Unsere Daten zeigen allerdings, dass die Herzmitochondrien von untrainierten HCR und LCR sich in ihrer maximalen respiratorischen Kapazität nicht unterscheiden. Dies war vom zugegebenen Substrat unabhängig.

Bei unseren Untersuchungen mit Fettsäuren wurden bei der Verwendung von Palmitoylcarnitin/Malat als Substrat keine Unterschiede in der respiratorischen Kapazität zwischen HCR und LCR beobachtet. Auch mit dem Substrat Palmitoyl-CoA/Carntin war die maximale respiratorische Kapazität von HCR und LCR in den Herz IFM gleich. Nur bei den Herz SSM deutete sich eine erhöhte respiratorische Kapazität der HCR an.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Aktivität der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase ( $\beta$ -HAD) - als Marker für die Kapazität der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren - 1,3-fach in den Herzmitochondrien von HCR erhöht war (Burniston et al. 2011). In dieser Arbeit wurde der tatsächliche Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien unter Zugabe von Fettsäuren gemessen. Somit kann eine Aussage vom Zeitpunkt der Fettoxidation bis hin zum letztendlichen Abbau zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  in der Atmungskette gemacht werden. Es wäre beispielsweise möglich, dass trotz einer erhöhten  $\beta$ -Oxidation bei den HCR der Sauerstoffverbrauch beim Abbau von Fettsäuren nicht erhöht ist, weil möglicherweise die Atmungskette limitierend ist und der Sauerstoffverbrauch damit gleich bleibt. Die Ergebnisse sprechen also dafür, dass die maximale respiratorische Kapazität der Herzmitochondrien von HCR und LCR entgegen unserer Hypothese nicht unterschiedlich ist.

### ***Maximale respiratorische Kapazitäten der Skelettmuskelmitochondrien***

Unterschiede der respiratorischen Kapazität des Skelettmuskels von HCR und LCR sind bekannt. Naples et al. zeigten eine dreifach erhöhte Fettsäureoxidation in isolierten Mitochondrien des M. gastrocnemius der HCR im Vergleich zu denen der LCR (Naples et al. 2010). Auch Seifert et al. zeigten anhand von Messungen mit einer Clark-Elektrode, dass die respiratorische Kapazität der Skelettmuskelmitochondrien von HCR deutlich höher als bei den LCR ist. Dabei wurden mit Pyruvat/Malat 30 %, mit Palmitoylecarnitin 40 % und mit Succinat 60 % höhere maximale respiratorische Kapazitäten bei den Mitochondrien der HCR gemessen (Seifert et al. 2012). Zudem zeigten Stephenson et al. sowohl im oxidativen M. soleus als auch im vorwiegend glykolytischen M. extensor digitorum longus erhöhte maximale respiratorische Kapazitäten der HCR (Stephenson et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die IFM des M. gastrocnemius der HCR mit allen untersuchten Substraten höhere maximale respiratorische Kapazitäten hatten als die der LCR. Bei den SSM war ähnliches zu erkennen, allerdings nicht mit allen Substraten. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse im Einklang mit den genannten Veröffentlichungen dafür, dass die erhöhte maximale respiratorische Kapazität im Skelettmuskel bei HCR wohl weder vom verwendeten Substrat noch vom Muskelfasertyp abhängig ist. Sowohl Mitochondrien aus roten als auch die aus bei uns vorwiegend verwendeten weißen Muskeln hatten in HCR eine höhere respiratorische Kapazität als die der LCR.

### ***Maximale respiratorische Kapazitäten der Lebermitochondrien***

Bei männlichen, 25 Wochen alten LCR beschrieben Thyfault et al. einen reduzierten mitochondrialen Gehalt in der Leber sowie eine mehr als 50 % geringere Palmitat-Oxidation im Vergleich zu HCR (Thyfault et al. 2009). Dies war mit einer erhöhten Ablagerung von Triacylglyceriden in der Leber und einem Leberschaden bei den LCR assoziiert. Dass eine geringe Fettsäureoxidation der Leber die Suszeptibilität für die Entwicklung einer Fettleber erhöht, ist bekannt (Laye et al. 2009).

Unsere Ergebnisse an 15 Wochen alten weiblichen Ratten zeigen keinen signifikanten Unterschied in der maximalen respiratorischen Kapazität der HCR und LCR. Die maximalen respiratorischen Kapazitäten der Lebermitochondrien in den HCR waren lediglich tendenziell er-



höht. Der Unterschied der Ergebnisse hängt womöglich mit dem unterschiedlichen Geschlecht und dem um 10 Wochen unterschiedlichen Alter der Versuchstiere zusammen.

## **7.2 Effekte von Training auf die Mitochondrienfunktion von HCR und LCR**

Die maximale Sauerstoffaufnahme ( $VO_{2max}$ ) ist ein Maß für die Ausdauerleistungsfähigkeit eines Individuums (Huang et al. 2005). Sie korreliert mit der Mitochondrienfunktion, welche ebenso durch Ausdauertraining beeinflusst wird (Hoppeler 1990, Larson-Meyer et al. 2000). Aufgrund des ungünstigen kardiovaskulären Risikoprofils der LCR (Wisloff et al. 2005) verwundert es nicht, dass HCR eine höhere  $VO_{2max}$  als LCR haben (Torma et al. 2014, Gonzalez et al. 2006, Johnsen et al. 2013a). Die  $VO_{2max}$  steigt durch Ausdauertraining in sehr unterschiedlichem Maße an. Die Ursache für diesen Unterschied ist unklar. Gezeigt wurde einerseits, dass die Höhe von  $VO_{2max}$  vor Beginn des Trainings keine Voraussagekraft für das Maß der  $VO_{2max}$ -Erhöhung durch Training hat (Huang et al. 2005, BOUCHARD und RANKINEN 2001). Andererseits trainierten Koch et al. Copenhagen Ratten beziehungsweise Dark Agouti Ratten aus Inzuchtstämmen mit niedriger beziehungsweise hoher intrinsischer Kapazität. Es zeigte sich, dass die Ratten mit hoher intrinsischer Kapazität unabhängig von der Art des Trainings ihre Ausdauerkapazität stärker verbesserten als die Ratten mit niedriger intrinsischer Kapazität (Koch et al. 2005). So konnte anhand der intrinsischen Kapazität doch eine Vorhersage zum Trainingserfolg gemacht werden. Interessanterweise wurde ebenfalls ein gegenteiliges Ergebnis veröffentlicht. Torma et al. zeigten, dass nach 12-wöchigem Training bei 60 % vom individuellen  $VO_{2max}$  die LCR ihr  $VO_{2max}$  auf das Level der HCR erhöhten, während das der HCR unverändert blieb (Torma et al. 2014). Es war ein Ziel dieser Arbeit, herauszufinden wie der Effekt von Ausdauertraining mit Intervallen von bis zu 80 % der individuellen  $VO_{2max}$  auf die Mitochondrienfunktion von Ratten mit hoher und von Ratten mit niedriger intrinsischer Kapazität ist.

### **7.2.1 Effekte auf die Citratsynthaseaktivität**

Ausdauertraining führt bei Menschen und Ratten zu einem erhöhten oxidativen Potential von Skelettmuskelgewebe. So wird die mitochondriale Funktion von Skelettmuskeln durch Trai-

ning erhöht. Dies geschieht durch vermehrte Biogenese und die Erhöhung verschiedener mitochondrialer Enzymaktivitäten (Adhihetty et al. 2003, Baldwin et al. 1972, Holloszy 1967).

Im Herzen als kontinuierlich kontrahierendem Muskel ist dieser Effekt weniger eindeutig gezeigt. Beispielsweise wurde beschrieben, dass der Volumenanteil der Mitochondrien in den Kardiomyozyten nicht so stark ansteigt wie im Skelettmuskel, denn der Volumenzuwachs hätte möglicherweise einen negativen Effekt auf die Herzleistung (Ascensao et al. 2005). Sprague-Dawley Ratten hatten nach zehnwöchigem Training zwar im Skelettmuskel erhöhte Citratsynthaseaktivität, allerdings war diese im Herzmuskel nicht verändert (Powers et al. 1998). Samelman hingegen zeigte nach langem Laufbandtraining eine deutlich erhöhte Citratsynthaseaktivität in Kardiomyozyten der Vorhöfe und Ventrikel von Fischer 344 Ratten (Samelman 2000). Sowohl im Skelettmuskel als auch im Herzmuskel zeigen unsere Ergebnisse erstmals den Effekt von Ausdauertraining auf die Mitochondrienfunktion von HCR und LCR.

Im Skelettmuskel stimmen unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen bei anderen Rattenstämmen überein. Im M. gastrocnemius zeigte sich eine erhöhte Citratsynthaseaktivität in den Mitochondrien der HCR und LCR nach dem Intervalltraining. Die Citratsynthaseaktivität in Herzmitochondrien der HCR wurde bei unseren Versuchen durch Training erhöht, während die der LCR absank. Unsere Ergebnisse zeigen also, dass die Herzmitochondrien der HCR anders auf Ausdauertraining reagieren als die der LCR. Wie schon durch Koch et al. vermutet, hatten untrainierte Tiere mit höherer maximaler respiratorischer Kapazität durch das Training einen größeren Zugewinn an mitochondrialer Aktivität als Tiere mit niedriger intrinsischer Kapazität (Koch et al. 2005).

## **7.2.2 Effekte auf die maximale respiratorische Kapazität**

### ***Effekte auf die maximale respiratorische Kapazität der Skelettmuskelmitochondrien***

Der Effekt von Ausdauertraining auf die respiratorische Kapazität von HCR und LCR ist bisher nur durch Lessard et al. beschrieben (Lessard et al. 2011). Sie zeigten, dass der Skelettmuskel M. soleus von HCR eine deutlich höhere Palmitat-Oxidation hatte als jener der LCR. Allerdings konnte hier sechswöchiges Ausdauertraining die Palmitat-Oxidation nur im Mus-

kel der LCR (um 40 %) steigern. Die Oxidationsraten der Mitochondrien der HCR blieben durch Training unverändert (Lessard et al. 2011).

Unsere Ergebnisse zeigen höhere maximale respiratorischen Kapazitäten der IFM des M. gastrocnemius bei den untrainierten HCR als bei den LCR. Dies war mit allen hinzugefügten Substraten der Fall. Allerdings waren sie nach dem Training im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lessard et al. nur bei den HCR erhöht (Lessard et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere individuell, relativ zu ihrer maximalen Fähigkeit trainiert und jedes Training war von 90 Minuten Dauer. Die HCR begannen dabei in der ersten Trainingswoche mit durchschnittlich 29,1 m/min, welche sie 80 % der Gesamtzeit liefen. LCR begannen im Schnitt bei 12,4 m/min. Das von Lessard et al. angewandte Ausdauertraining war nicht individualisiert. Unabhängig von der genetischen Prädisposition hatte jedes Tier nach sechs Wochen dieselbe absolute Distanz zurückgelegt. Alle Tiere begannen mit einer Laufgeschwindigkeit von 10 m/min und einer Trainingsdauer von 20 Minuten und steigerten sich bis zur letzten Trainingssession auf 31,5 Minuten bei 20 m/min (Lessard et al. 2011, Koch et al. 2005).

So kann angenommen werden, dass die HCR mit dem von Lessard et al. angewandten Protokoll weniger gefordert waren als mit unserem Protokoll. So kann es sein, dass der Trainingsreiz bei Lessard et al. für die HCR nicht groß genug war, während er für die Skelettmuskeln der LCR ausreichte. Vor diesem Hintergrund ist das Ergebnis nicht mit unseren Erkenntnissen vergleichbar. Das Geschlecht der Versuchstiere ist in der Veröffentlichung von Lessard et al. nicht beschrieben, so dass offen bleibt, ob Unterschiede des Geschlechts ebenfalls einen Einfluss auf die unterschiedlichen Ergebnisse hatten. Wir zeigen, dass sich bei adäquatem Ausdauertraining die respiratorische Kapazität der IFM des Skelettmuskels der HCR erhöht, die der LCR nicht. Der Effekt von Training auf die maximale mitochondriale Kapazität in den IFM des M. gastrocnemius war also von der genetischen Prädisposition für Ausdauerleistungsfähigkeit abhängig.

### ***Effekte auf die maximale respiratorische Kapazität der Herzmuskelmitochondrien***

Im Herzen wurde der Effekt von Ausdauertraining auf die Mitochondrienfunktion bisher wenig untersucht. Achtwöchiges Schwimmtraining führte bei zwölf Wochen alten Sprague-

Dawley Ratten zu einer Reduktion der maximalen respiratorischen Kapazität der Herzmitochondrien. Hierbei wurden Pyruvat in Kombination mit Malat, und  $\alpha$ -Ketoglutarat als Substrate von Komplex I verwendet (Leichtweis et al. 1997). Lauftraining führte zu einer temporären Reduktion der maximalen respiratorischen Kapazitäten mit Komplex I-Substraten bei diesen Ratten. Dabei war die maximale respiratorische Kapazität nach sechs Wochen Training zwar erniedrigt, jedoch nach zehn Wochen wieder fast auf dem Ausgangsniveau (Schoepe et al. 2012).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich die respiratorische Kapazität der IFM und SSM des Herzens der HCR durch vierwöchiges Lauftraining erhöht. Die Mitochondrien der LCR zeigten auch eine Erhöhung, allerdings nur in SSM. So kann man vermuten, dass die IFM von Individuen mit hoher intrinsischer Kapazität besonders stark auf Training reagieren, denn eine Erhöhung der respiratorischen Kapazität wurde lediglich bei den HCR beobachtet. Die Regulation der respiratorischen Kapazität scheint bei Sprague-Dawley Ratten anders zu sein als bei den HCR und LCR. Einen Einfluss hat sicher auch die deutlich größere Variabilität der Sprague-Dawley Ratten, denn im Gegensatz zum HCR-LCR-Modell wurde keine spezielle Selektion durchgeführt. Ob die respiratorische Kapazität der HCR und LCR zeitweise reduziert war, konnten wir durch den einmaligen Messzeitpunkt im Verlauf nicht überprüfen.

Betrachtet man die Fettoxidation in den SSM des Herzen genauer, lässt sich eine Besonderheit feststellen. Bei den HCR war nach dem Laufbandtraining die maximale respiratorische Kapazität mit dem Substrat Palmitoyl-CoA/Carnitin/Malat reduziert (Anhang, Tab. 16). Bei den LCR war sie um 80 % erhöht. Da langkettige Fettsäuren nicht einfach durch die innere Mitochondrienmembran diffundieren können, benötigen sie ein spezielles Transportsystem. Sie gelangen mittels Carnitin-Palmitoyltransferase-System in die mitochondriale Matrix. Die aktivierte Fettsäure und das Carnitin aus der eingesetzten Substratkombination Palmitoyl-CoA/Carnitin/Malat werden durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) zu Palmitoylcarnitin verbunden. Sie können dann mittels Carnitin-Acylcarnitin-Transporter (CACT) die innere Membran überwinden. Die CPT1 ist im Allgemeinen das limitierende Enzym für den Transport von langkettigen Fettsäuren in die Mitochondrienmatrix (Amorim 2015). Dieses Enzym ist für den Transport des Substrates Palmitoylcarnitin/Malat hingegen nicht nötig, denn die bereits an Carnitin gebundene Fettsäure kann direkt mittels CACT in die Matrix geschleust werden. Bei Verwendung dieses Substrates gab es keine Unterschiede zwischen untrainierten und trainierten HCR und LCR.

Mit den beschriebenen Veränderungen kann vermutet werden, dass die CPT1-Aktivität der Herz SSM bei den LCR durch Training erhöht wird und die Oxidation von Fettsäuren bei untrainierten LCR durch CPT1 wahrscheinlich limitiert wird. Bei den untrainierten HCR scheint die CPT1 hingegen nicht limitierend zu sein, möglicherweise wird sie durch Training limitierend. Dies ist ein Hinweis auf eine unterschiedliche Regulation der am Fettstoffwechsel beteiligten Enzyme bei HCR und LCR. Eine große Rolle beim Fett- und Glukosestoffwechsel bei und nach körperlicher Belastung spielt die Leber (Wahren et al. 1971, Tate et al. 1982), so dass die Untersuchung der Lebermitochondrien ein weiterer Gegenstand der Arbeit war.

### ***Effekte auf die maximale respiratorische Kapazität der Lebermitochondrien***

Der Effekt von Ausdauertraining auf die Mitochondrienfunktion in der Leber wurde bisher bei HCR und LCR nicht untersucht. Allerdings gibt es Untersuchungen bei anderen Rattenstämmen zum Effekt von Training auf die Mitochondrienfunktion der Leber. Bei Sprague-Dawley Ratten erhöhte einmaliges Schwimmen die maximale respiratorische Kapazität der Lebermitochondrien (Tate et al. 1982). Bei Wistar Ratten waren auch die Aktivitäten der mitochondrialen Komplexe I, IV und V nach 8-wöchigem Ausdauertraining erhöht (Sun et al. 2010). Bei männlichen Hybriden aus Fisher 344 und Brown Norway gab es hingegen nach freiwilligem 9-wöchigem Laufradtraining keine Veränderung der Palmitatoxidation (Laye et al. 2009).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei HCR und LCR keine signifikanten Veränderungen der maximalen respiratorischen Kapazität nach dem Ausdauertraining. Es kann allerdings sein, dass die Lebermitochondrien der trainierten Tiere beider Phänotypen trotz leicht niedrigerem Sauerstoffverbrauch gleich viel ATP produzieren können wie die Kontrolltiere. Um dies einschätzen zu können, benötigt man den ADP:O-Quotienten. Dieser ist ein Maß für die Menge ATP, die pro reduziertem Sauerstoffatom produziert wird (Hinkle 2005) und somit für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (Ascensao et al. 2005). Wenn man die maximale respiratorische Kapazität mit dem ADP:O-Quotienten multipliziert, kann man die relative ATP Produktion abschätzen. Diese ist bei Kontrolltieren und trainierten Tieren bei fast allen Substraten sehr ähnlich (Anhang, Tab. 17), was die obige Vermutung stützt. So sinkt die respiratorische Kapazität der Lebermitochondrien durch Ausdauertraining zwar bei einigen Substraten, aber die ATP Produktion bleibt möglicherweise konstant.

## **7.3 Morphometrie von HCR und LCR in Ruhe und nach Ausdauertraining**

### **7.3.1 Morphometrie des Herzens der HCR und LCR und der Effekt von Ausdauertraining**

Es sind Unterschiede der Herzmorphometrie und –funktion von HCR und LCR bekannt. Das maximale Schlagvolumen pro Herz- und Körpergewicht (Gonzalez et al. 2006) und das Herzzeitvolumen (Hussain et al. 2001, Klemcke et al. 2009) waren bei den HCR höher als bei den LCR. Die maximale Herzfrequenz beider Phänotypen hingegen war identisch (Gonzalez et al. 2006). HCR hatten ein größeres relatives Herzgewicht (Gonzalez et al. 2006, Wisloff et al. 2005) und der Herzindex als Maß für die Herzleistung war ebenfalls bei den HCR erhöht (DeMarco et al. 2012). Jedoch zeigten Hussain et al. im Gegensatz zu den eben genannten und den vorliegenden Ergebnissen keinen Unterschied des relativen Herzgewichtes (Hussain et al. 2001).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass HCR und LCR sich in der Größe ihrer Organe und somit auch in der relativen Organzusammensetzung ihres Körpers voneinander unterscheiden. Ein Ergebnis dieser Arbeit ist, dass HCR ein größeres relatives Herzgewicht vorweisen als LCR, was als Hinweis für eine höhere Herzleistung der HCR gewertet werden kann. Kardiale Hypertrophie ist eine Adaptation des Herzens auf physischen Stress. Ausdauertraining oder Schwangerschaft führen zu exzentrischer Hypertrophie mit Volumen- und Wanddickenzunahme des Herzens. Diese Art der Hypertrophie wird auch als physiologisch bezeichnet (Beisvag et al. 2009). Arterielle Hypertonie führt hingegen zu einer konzentrischen Hypertrophie ohne Volumenzunahme und mit myokardialer Dysfunktion, die auch als pathologische Hypertrophie bezeichnet wird (Wang et al. 2010, Beisvag et al. 2009). Sowohl HCR als auch LCR zeigen nach Ausdauertraining einen Massenzuwachs des linken Herzens, verbunden mit einer Steigerung der Zelllänge (Wisloff et al. 2005). Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls erhöhte Herzgewichte beider Phänotypen nach dem Training. Vermutlich handelt es sich um exzentrische Hypertrophie, was mittels Echokardiografie untersucht werden könnte.

### **7.3.2 Morphometrie des Skelettmuskels und Körpergewicht der HCR und LCR und der Effekt von Ausdauertraining**

HCR haben zwar eine geringere absolute Muskelmasse als LCR, allerdings die gleiche Zahl an Muskelfasern und Kapillaren, was eine höhere Kapillardichte und somit bessere Sauerstoffverfügbarkeit bedeutet (Howlett et al. 2003). Das relative Gewicht des M. gastrocnemius

bezogen auf das Körpergewicht war bei HCR und LCR gleich (Gonzalez et al. 2006). Der im Muskel ankommende Sauerstoff bildet die Grundlage für den oxidativen Stoffwechsel bei Belastung. So lässt sich vermuten, dass die leichtere, aber besser versorgte Muskulatur der HCR einen Vorteil für hohe Laufleistung darstellt. So sparen beispielsweise auch Vögel durch leichte Flugmuskeln mit kleiner Fasergröße energetischen Aufwand beim Fliegen (Swaddle und Biewener 2000). Houle-Leroy et al. berichteten von Tieren, welche zu freiwilligem Lauf-  
radtraining gezüchtet wurden. Nach achtwöchigem, freiem Zugang zu einem Laufrad war eine Verminderung des Körpergewichtes zu beobachten. Die Muskulatur der Hinterläufe, zu denen auch der M. gastrocnemius zählt, war ebenso verkleinert (Houle-Leroy et al. 2003). Muskelzuwachs ist hingegen ein typischer Effekt von Krafttraining oder kombiniertem Kraft- und Ausdauertraining (McCarthy et al. 1995, Bell et al. 2000). Auch Ausdauertraining kann zu Muskelzuwachs führen (Hie et al. 1987). Dies hängt stark von der Intensität, Dauer und Art des Trainings ab (Bell et al. 2000, Karavirta et al. 2011)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Anstieg des Körpergewichts der HCR durch Training. Dies ist wahrscheinlich auf den Zuwachs an Muskelmasse zurückzuführen, denn die Gewichte des M. soleus und M. gastrocnemius dieser Tiere erhöhten sich nach dem Training. Der Gewichtszuwachs des M. soleus war sogar überproportional zum Anstieg des Körpergewichts. Ein reines Ausdauertraining hätte eher eine Abnahme des Muskelgewichts erwarten lassen. Die hier verwendete Trainingsmethode hingegen war durch die 25°-Steigung des Laufbandes mit einem wesentlichen Kraftanteil verbunden, der die Gesamtbelastung der Tiere und damit den Trainingseffekt intensivieren sollte. Dieser stellte womöglich einen Hypertrophiereiz für die Muskulatur dar, so dass die Masse der Muskeln durch das Training anstieg. Des Weiteren handelt es sich bei Houle-Leroy um ein anderes Tier- und Trainingsmodell (Houle-Leroy et al. 2003) und bei der Betrachtung von Körper- und Muskelgewicht spielen auch andere Faktoren wie die Nahrungsaufnahme und -zusammensetzung eine Rolle. In einigen Studien wurde gezeigt, dass HCR beider Geschlechter eine größere Nahrungsaufnahme hatten als LCR (Smyers et al. 2015, Thyfault et al. 2009, Liu et al. 2015). Es wäre sinnvoll, den Nahrungsverbrauch in weiteren Untersuchungen zu bestimmen.

## **7.4 Unterschiede der IFM und SSM und Effekte von Training auf die IFM und SSM**

Die beiden Mitochondrienpopulationen IFM und SSM unterscheiden sich in ihren Lokalisationen und besitzen auch unterschiedliche biochemische Eigenschaften (Palmer et al. 1977). Beispielsweise sind die Cristae bei den IFM des Herzens tubulär, während sie bei den SSM lamellenförmig sind (Riva et al. 2005). Die IFM sind relativ zu den SSM kleiner und weniger komplex (Schwarzer et al. 2013). Auch die Mitochondrienfunktion der IFM und SSM des Herzens wurde bei Sprague Dawley Ratten (Palmer et al. 1977, Schwarzer et al. 2013) und bei Long-Evans Ratten (Bizeau et al. 1998) bereits untersucht, wobei eine höhere respiratorische Kapazität der IFM festgestellt wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss von mechanischen Reizen auf die Mitochondrienfunktion gezeigt. Die maximale respiratorische Kapazität erniedrigte sich durch mechanische Drucküberlastung in IFM und SSM, wobei sich die der IFM stärker veränderte. Dies könnte für eine primäre Funktion der IFM bei der Kontraktion sprechen (Schwarzer et al. 2013).

Unsere Ergebnisse fügen sich gut in dieses Bild ein. Im Herzen zeigten bei den untrainierten HCR und LCR die IFM tendenziell höhere respiratorische Kapazitäten als die SSM. Die Komplexität der IFM des Herzens unserer Kontrolltiere war niedriger als die der SSM; die relative Größe unterschied sich jedoch nicht. Der Unterschied in der Komplexität könnte durch den andersartigen Aufbau der Cristae bedingt sein. Es ließen sich weiterhin unterschiedliche Effekte von Training auf die respiratorischen Kapazitäten der getrennt isolierten SSM und IFM des Herzens beobachten. Bei den HCR stiegen durch Training die respiratorischen Kapazitäten der IFM und SSM im Herzen, während bei den LCR nur die Kapazitäten der SSM im Herzen anstiegen.

Im Skelettmuskel der Ratte wurde bereits gezeigt, dass die maximalen respiratorischen Kapazitäten der IFM der Hinterlaufmuskeln bei Long-Evans und Sprague-Dawley Ratten höher sind als die der SSM (Bizeau et al. 1998, Cogswell et al. 1993). Auch die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe Cytochrom C-Oxidase und Succinat-Dehydrogenase waren in den IFM des Skelettmuskels erhöht (Cogswell et al. 1993). Außerdem wurde der Effekt von Ausdauertraining auf die oxidative Kapazität von IFM und SSM untersucht, welche durch sechs-wöchiges Laufbandtraining substratspezifisch und im unterschiedlichen Maße erhöht wurde (Bizeau et al. 1998, Krieger et al. 1980).

Bei den HCR und LCR zeigen wir entgegengesetzte Unterschiede der IFM und SSM. Die IFM der untrainierten HCR und LCR hatten im M. gastrocnemius mit allen verwendeten



Substraten eine deutlich niedrigere respiratorische Kapazität als die SSM. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die IFM des Skelettmuskels von HCR und LCR signifikant kleiner und weniger komplex sind. Auch was die Veränderungen durch Ausdauertraining angeht, sind unsere Ergebnisse mit den HCR und LCR deutlich abweichend von denen der Long-Evans Ratten (Bizeau et al. 1998). Training hatte im Skelettmuskel unterschiedliche Effekte auf die Mitochondrienpopulationen der beiden Phänotypen. Bei den HCR stiegen die respiratorischen Kapazitäten der IFM des M. gastrocnemius an, die der SSM waren weniger verändert, aber tendenziell auch erhöht. Bei den LCR hingegen wurden die respiratorischen Kapazitäten der IFM im M. gastrocnemius durch Training tendenziell erniedrigt, die der SSM stiegen leicht. Es scheint, als würden die Mitochondrien der HCR tendenziell ähnlich auf einen Ausdauerreiz reagieren wie die Long-Evans Ratten, während die der LCR entgegengesetzte Veränderungen zeigen.

Die respiratorische Kapazität der IFM des Herzens und des M. gastrocnemius wurden nur bei den HCR durch Training erhöht. Beim Training wird mehr Energie für die Muskelkontraktion benötigt. Deshalb könnten unsere Ergebnisse die Hypothese stützen, dass bei HCR das für die Muskelkontraktion benötigte ATP hauptsächlich von den IFM bereitgestellt wird (Ritov et al. 2005, Schwarzer et al. 2013). Diese Funktion der IFM scheint abhängig vom Phänotyp zu sein und bei den LCR möglicherweise nicht zuzutreffen, denn die Mitochondrien der LCR reagierten entgegengesetzt auf das Training. Die SSM könnten ihrerseits, eher für die Energiebereitstellung von Prozessen an der Zelloberfläche, wie Ionen- und Substrattransport oder Zell-Zell-Kommunikation, zuständig sein (Ritov et al. 2005). Dazu passt, dass sich die respiratorischen Kapazitäten der IFM im Herzen und im Skelettmuskel durch Training viel stärker änderten als die der SSM, also die IFM sensibler für Trainingsreize waren.

## 8 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt, dass der Effekt von Ausdauertraining auf die respiratorische Kapazität von Mitochondrien im Herz und im Skelettmuskel von der genetischen Prädisposition für intrinsische Leistungsfähigkeit abhängt. Vor dem Ausdauertraining waren die maximalen respiratorischen Kapazitäten von HCR und LCR nur im Skelettmuskel unterschiedlich, wo die Mitochondrien der HCR höhere Kapazitäten hatten. Nach dem Training war die maximale respiratorische Kapazität von IFM des Herz- und Skelettmuskels nur bei den HCR erhöht. Die Citratsynthaseaktivität der Herzmitochondrien war ebenso nur bei den HCR erhöht. Zu diesem Effekt führte das individuelle Training, welches jede Ratte entsprechend ihrem Niveau gleich forderte.

Ebenso verändert Ausdauertraining die Morphometrie in Abhängigkeit vom Phänotyp. Das Herzgewicht war im Sinne einer Hypertrophie bei HCR und LCR nach dem vierwöchigen Ausdauertraining gesteigert. Das Körper-, M. soleus- und Lebergewicht war hingegen nur bei den HCR erhöht.

### *Ausblick*

Zukünftig ist die Betrachtung der makroskopischen Veränderungen sowie Funktionsparameter der Rattenherzen unter dem Einfluss von Ausdauertraining mittels Echokardiografie geplant. Des Weiteren wäre es sinnvoll, die Mechanismen der Regulation und die Funktion der Atmungskette bei HCR und LCR zu untersuchen. Hierzu wäre die Messung der Aktivitäten der einzelnen Atmungskettenkomplexe geeignet. Auch die Frage, inwieweit der Metabolismus der LCR mit diabetischer Stoffwechsellage und erhöhten Triglyceriden einen Effekt auf die Mitochondrienfunktion hat, ist offen. Reaktive Sauerstoffspezies können die Mitochondrienfunktion beeinflussen. Ebenso die metabolischen Veränderungen bei einem Diabetes mellitus. Die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Durchführung von Western Blot von Proteinen der Insulinsignalkaskade könnten weiteren Aufschluss geben. Perspektivisch wäre somit zu klären, warum und wie der Effekt des Ausdauertrainings auf die Mitochondrienfunktion von Herz- und Skelettmuskel von der intrinsischen Ausdauerleistungsfähigkeit des Individuums abhängt.

## 9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aasum E, Hafstad AD, Severson DL, Larsen TS. 2003. Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. *Diabetes*, 52 (2):434-441.
- Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol*, 88 (1):99-107.
- Andersen L, Schnohr P, Schroll M, Hein H. 2000. All-cause mortality associated with physical activity during leisure time, work, sports, and cycling to work. *Archives of Internal Medicine*, 160 (11):1621-1628.
- Ascensao AA, Magalhaes JF, Soares JM, Ferreira RM, Neuparth MJ, Appell HJ, Duarte JA. 2005. Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. *Int J Sports Med*, 26 (4):258-267.
- Baldwin KM, Klinkerfuss GH, Terjung RL, Mole PA, Holloszy JO. 1972. Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptive response to exercise. *Am J Physiol*, 222 (2):373-378.
- Ballinger SW. 2005. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 38 (10):1278-1295.
- Befroy DE, Petersen KF, Dufour S, Mason GF, de Graaf RA, Rothman DL, Shulman GI. 2007. Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 56 (5):1376-1381.
- Beisvag V, Kemi OJ, Arbo I, Loennechen JP, Wisloff U, Langaas M, Sandvik AK, Ellingsen O. 2009. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 16 (6):690-697.
- Bell GJ, Syrotaik D, Martin TP, Burnham R, Quinney HA. 2000. Effect of concurrent strength and endurance training on skeletal muscle properties and hormone concentrations in humans. *Eur J Appl Physiol*, 81 (5):418-427.
- Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR. 1998. Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Appl Physiol* (1985), 85 (4):1279-1284.
- Blair SN, Kohl HW, Iii, Paffenbarger RS, Jr, Clark DG, Cooper KH, Gibbons LW. 1989. Physical fitness and all-cause mortality: A prospective study of healthy men and women. *JAMA*, 262 (17):2395-2401.
- Blomstrand E, Radegran G, Saltin B. 1997. Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. *J Physiol*, 501 ( Pt 2):455-460.
- BOUCHARD C, RANKINEN T. 2001. Individual differences in response to regular physical activity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 33 (6):S446-S451.
- Bouchard C, Lesage R, Lortie G, Simoneau JA, Hamel P, Boulay MR, Perusse L, Theriault G, Leblanc C. 1986. Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. *Med Sci Sports Exerc*, 18 (6):639-646.
- Boudina S, Abel ED. 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, 115 (25):3213-3223.
- Bournat JC, Brown CW. 2010. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 17 (5):446-452.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2):248-254.
- Bruce CR, Kriketos AD, Cooney GJ, Hawley JA. 2004. Disassociation of muscle triglyceride content and insulin sensitivity after exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 47 (1):23-30.
- Burniston JG, Kenyani J, Wastling JM, Burant CF, Qi NR, Koch LG, Britton SL. 2011. Proteomic analysis reveals perturbed energy metabolism and elevated oxidative stress in hearts of rats with inborn low aerobic capacity. *Proteomics*, 11 (16):3369-3379.

- Bylund AC, Bjuro T, Cederblad G, Holm J, Lundholm K, Sjöström M, Angquist KA, Schersten T. 1977. Physical training in man. Skeletal muscle metabolism in relation to muscle morphology and running ability. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 36 (3):151-169.
- Carter SL, Rennie CD, Hamilton SJ, Tarnopolsky. 2001. Changes in skeletal muscle in males and females following endurance training. *Can J Physiol Pharmacol*, 79 (5):386-392.
- Chance B, Williams GR. 1955. A Method for the Localization of Sites for Oxidative Phosphorylation. *Nature*, 176 (4475):250-254.
- Chi MM, Hintz CS, Coyle EF, Martin WH, 3rd, Ivy JL, Nemeth PM, Holloszy JO, Lowry OH. 1983. Effects of detraining on enzymes of energy metabolism in individual human muscle fibers. *Am J Physiol*, 244 (3):C276-287.
- Church TS, Cheng YJ, Earnest CP, Barlow CE, Gibbons LW, Priest EL, Blair SN. 2004. Exercise capacity and body composition as predictors of mortality among men with diabetes. *Diabetes Care*, 27 (1):83-88.
- Coffey VG, Hawley JA. 2007. The molecular bases of training adaptation. *Sports medicine*, 37 (9):737-763.
- Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA. 1993. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol*, 264 (2 Pt 1):C383-389.
- Dela F, Larsen JJ, Mikines KJ, Ploug T, Petersen LN, Galbo H. 1995. Insulin-stimulated muscle glucose clearance in patients with NIDDM. Effects of one-legged physical training. *Diabetes*, 44 (9):1010-1020.
- DeMarco VG, Johnson MS, Ma L, Pulakat L, Mugerfeld I, Hayden MR, Garro M, Knight W, Britton SL, Koch LG, Sowers JR. 2012. Overweight female rats selectively breed for low aerobic capacity exhibit increased myocardial fibrosis and diastolic dysfunction.
- Dohm GL, Huston RL, Askew EW, Weiser PC. 1972. Effects of exercise on activity of heart and muscle mitochondria. *Am J Physiol*, 223 (4):783-787.
- Drake JC, Wilson RJ, Yan Z. 2016. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *FASEB J*, 30 (1):13-22.
- Ekelund LG, Haskell WL, Johnson JL, Whaley FS, Criqui MH, Sheps DS. 1988. Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The Lipid Research Clinics Mortality Follow-up Study. *N Engl J Med*, 319 (21):1379-1384.
- Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F, Geny B, Mettauer B, Veksler V, Ventura-Clapier R. 2009. Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail*, 2 (4):342-350.
- Gielen S, Schuler G, Adams V. 2010. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation*, 122 (12):1221-1238.
- Gillen JB, Percival ME, Skelly LE, Martin BJ, Tan RB, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. 2014. Three Minutes of All-Out Intermittent Exercise per Week Increases Skeletal Muscle Oxidative Capacity and Improves Cardiometabolic Health. *PLoS ONE*, 9 (11):e111489.
- Gonzalez NC, Kirkton SD, Howlett RA, Britton SL, Koch LG, Wagner HE, Wagner PD. 2006. Continued divergence in VO<sub>2</sub>max of rats artificially selected for running endurance is mediated by greater convective blood O<sub>2</sub> delivery. *J Appl Physiol* (1985), 101 (5):1288-1296.
- Gould MK, Rawlinson WA. 1959. Biochemical adaptation as a response to exercise. Effect of swimming on the levels of lactic dehydrogenase, malic dehydrogenase and phosphorylase in muscles of 8-, 11- and 15-week-old rats. *Biochem J*, 73:41-44.
- Gurtubay JI, Goni FM, Gomez-Fernandez JC, Otamendi JJ, Macarulla JM. 1980. Triton X-100 solubilization of mitochondrial inner and outer membranes. *J Bioenerg Biomembr*, 12 (1-2):47-70.
- Hearn GR, Wainio WW. 1956. Succinic dehydrogenase activity of the heart and skeletal muscle of exercised rats. *Am J Physiol*, 185 (2):348-350.
- Henderson KK, Wagner H, Favret F, Britton SL, Koch LG, Wagner PD, Gonzalez NC. 2002. Determinants of maximal O<sub>2</sub> uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. *J Appl Physiol* (1985), 93 (4):1265-1274.
- Henriksson J. 1977. Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise. *J Physiol*, 270 (3):661-675.

- Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*, 48 (10):1819-1827.
- Hie HB, van Nie CJ, Vermeulen-van der Zee E. 1987. Effect of endurance exercise on fibre type composition and muscle weight of reinnervating rat plantaris muscle. *Pflugers Arch*, 408 (4):333-337.
- Hinkle PC. 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1706 (1-2):1-11.
- Holloszy JO. 1967. Biochemical Adaptations in Muscle: EFFECTS OF EXERCISE ON MITOCHONDRIAL OXYGEN UPTAKE AND RESPIRATORY ENZYME ACTIVITY IN SKELETAL MUSCLE. *Journal of Biological Chemistry*, 242 (9):2278-2282.
- Holloszy JO, Oscai LB, Don IJ, Molé PA. 1970. Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: Adaptive response to exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40 (6):1368-1373.
- Hoppeler H. 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med*, 7 (4):187-204.
- Hoppeler H. 1990. The different relationship of VO<sub>2</sub>max to muscle mitochondria in humans and quadrupedal animals. *Respir Physiol*, 80 (2-3):137-145.
- Houle-Leroy P, Guderley H, Swallow JG, Garland T, Jr. 2003. Artificial selection for high activity favors mighty mini-muscles in house mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (2):R433-443.
- Houmard JA, Shaw CD, Hickey MS, Tanner CJ. 1999. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 277 (6 Pt 1):E1055-1060.
- Howlett RA, Gonzalez NC, Wagner HE, Fu Z, Britton SL, Koch LG, Wagner PD. 2003. Selected contribution: skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. *J Appl Physiol* (1985), 94 (4):1682-1688.
- Huang G, Gibson CA, Tran ZV, Osness WH. 2005. Controlled endurance exercise training and VO<sub>2</sub>max changes in older adults: a meta-analysis. *Prev Cardiol*, 8 (4):217-225.
- Hussain SO, Barbato JC, Koch LG, Metting PJ, Britton SL. 2001. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281 (6):R1787-1791.
- Johnsen AB, Rolim NPL, Stølen T, Alves M, Sousa MML, Slupphaug G, Britton SL, Koch LG, Smith GL, Wisløff U, Høydal MA. 2013a. Atrial Myocyte Function and Ca(2+) Handling Is Associated with Inborn Aerobic Capacity. *PLoS ONE*, 8 (10):e76568.
- Johnsen VL, Belke DD, Hughey CC, Hittel DS, Hepple RT, Koch LG, Britton SL, Shearer J. 2013b. Enhanced cardiac protein glycosylation (O-GlcNAc) of selected mitochondrial proteins in rats artificially selected for low running capacity. *Physiological Genomics*, 45 (1):17-25.
- Karavirta L, Hakkinen A, Sillanpaa E, Garcia-Lopez D, Kauhanen A, Haapasaari A, Alen M, Pakarinen A, Kraemer WJ, Izquierdo M, Gorostiaga E, Hakkinen K. 2011. Effects of combined endurance and strength training on muscle strength, power and hypertrophy in 40-67-year-old men. *Scand J Med Sci Sports*, 21 (3):402-411.
- Klemcke HG, Ryan KL, Britton SL, Koch LG, Dubick MA, Convertino VA. 2009. Rat strains bred for aerobic running capacity do not differ in their survival time to hemorrhage. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ), 234 (12):1503-1510.
- Knight-Lozano CA, Young CG, Burow DL, Hu ZY, Uyeminami D, Pinkerton KE, Ischiropoulos H, Ballinger SW. 2002. Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. *Circulation*, 105 (7):849-854.
- Koch LG, Britton SL. 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats.
- Koch LG, Green CL, Lee AD, Hornyak JE, Cicila GT, Britton SL. 2005. Test of the principle of initial value in rat genetic models of exercise capacity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288 (2):R466-472.
- Koch LG, Kemi OJ, Qi N, Leng SX, Bijma P, Gilligan LJ, Wilkinson JE, Wisloff H, Høydal MA, Rolim N, Abadir PM, van Grevenhof EM, Smith GL, Burant CF, Ellingsen O, Britton SL,

- Wisloff U. 2011. Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. *Circ Res*, 109 (10):1162-1172.
- Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, Sugawara A, Totsuka K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. 2009. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. *JAMA*, 301 (19):2024-2035.
- Krieger DA, Tate CA, McMillin-Wood J, Booth FW. 1980. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 48 (1):23-28.
- Kujala UM, Kaprio J, Koskenvuo M. 2002. Modifiable risk factors as predictors of all-cause mortality: the roles of genetics and childhood environment. *Am J Epidemiol*, 156 (11):985-993.
- Kujala UM, Sarna S, Kaprio J, Tikkanen HO, Koskenvuo M. 2000. Natural selection to sports, later physical activity habits, and coronary heart disease. *Br J Sports Med*, 34 (6):445-449.
- Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, Hey-Mogensen M. 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol*, 590 (Pt 14):3349-3360.
- Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Hunter GR, Hetherington HP, Weinsier RL. 2000. <sup>31</sup>P MRS measurement of mitochondrial function in skeletal muscle: reliability, force-level sensitivity and relation to whole body maximal oxygen uptake. *NMR Biomed*, 13 (1):14-27.
- Laye MJ, Rector RS, Borengasser SJ, Naples SP, Uptergrove GM, Ibdah JA, Booth FW, Thyfault JP. 2009. Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue. *J Appl Physiol* (1985), 106 (1):161-168.
- Lee IM, Skerrett PJ. 2001. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? *Med Sci Sports Exerc*, 33 (6 Suppl):S459-471; discussion S493-454.
- Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Parmelee DJ, Fiebig R, Ji LL. 1997. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiol Scand*, 160 (2):139-148.
- Lessard SJ, Rivas DA, Stephenson EJ, Yaspelkis BB, Koch LG, Britton SL, Hawley JA. 2011. Exercise training reverses impaired skeletal muscle metabolism induced by artificial selection for low aerobic capacity.
- Li M, Absher PM, Liang P, Russell JC, Sobel BE, Fukagawa NK. 2001. High glucose concentrations induce oxidative damage to mitochondrial DNA in explanted vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med* (Maywood), 226 (5):450-457.
- Liu TW, Park YM, Holscher HD, Padilla J, Scroggins RJ, Welly R, Britton SL, Koch LG, Vieira-Potter VJ, Swanson KS. 2015. Physical Activity Differentially Affects the Cecal Microbiota of Ovariectomized Female Rats Selectively Bred for High and Low Aerobic Capacity. *PLoS One*, 10 (8):e0136150.
- Lowell BB, Shulman GI. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, 307 (5708):384-387.
- McCarthy JP, Agre JC, Graf BK, Pozniak MA, Vailas AC. 1995. Compatibility of adaptive responses with combining strength and endurance training. *Med Sci Sports Exerc*, 27 (3):429-436.
- Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. 2002. Exercise Capacity and Mortality among Men Referred for Exercise Testing. *New England Journal of Medicine*, 346 (11):793-801.
- Naples SP, Borengasser SJ, Rector RS, Uptergrove GM, Morris EM, Mikus CR, Koch LG, Britton SL, Ibdah JA, Thyfault JP. 2010. Skeletal Muscle Mitochondrial and Metabolic Responses to a High Fat Diet in Female Rats Bred for High and Low Aerobic Capacity. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 35 (2):151-162.
- Oakes ND, Thalen P, Aasum E, Edgley A, Larsen T, Furler SM, Ljung B, Severson D. 2006. Cardiac metabolism in mice: tracer method developments and in vivo application revealing profound metabolic inflexibility in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290 (5):E870-881.
- Oguma Y, Sesso HD, Paffenbarger RS, Lee I-M. 2002. Physical activity and all cause mortality in women: a review of the evidence. *British Journal of Sports Medicine*, 36 (3):162-172.
- Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. 1977. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 252 (23):8731-8739.

- Pchelenko LD. 1978. [Increase in heat production by muscle contraction caused by 2,4-dinitrophenol]. *Biull Eksp Biol Med*, 86 (8):137-139.
- Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J. 1998. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*, 275 (5 Pt 2):R1468-1477.
- Puchowicz MA, Varnes ME, Cohen BH, Friedman NR, Kerr DS, Hoppel CL. 2004. Oxidative phosphorylation analysis: assessing the integrated functional activity of human skeletal muscle mitochondria—case studies. *Mitochondrion*, 4 (5–6):377-385.
- Ren Y-y, Overmyer KA, Qi NR, Treutelaar MK, Heckenkamp L, Kalahar M, Koch LG, Britton SL, Burant CF, Li JZ. 2013. Genetic Analysis of a Rat Model of Aerobic Capacity and Metabolic Fitness. *PLoS ONE*, 8 (10):e77588.
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. 2005. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 54 (1):8-14.
- Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FG, Goodpaster BH, Ruderman NB, Kelley DE. 2010. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (1):E49-58.
- Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C. 2005. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (2):H868-872.
- Rivas DA, Lessard SJ, Saito M, Friedhuber AM, Koch LG, Britton SL, Yaspelkis BB, 3rd, Hawley JA. 2011. Low intrinsic running capacity is associated with reduced skeletal muscle substrate oxidation and lower mitochondrial content in white skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300 (4):R835-843.
- Ryan TE, Southern WM, Brizendine JT, McCully KK. 2013. Activity-induced changes in skeletal muscle metabolism measured with optical spectroscopy. *Medicine and science in sports and exercise*, 45 (12):10.1249/MSS.1240b1013e31829a31726a.
- Samelman TR. 2000. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol*, 85 (1):92-102.
- Saraste M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283 (5407):1488-1493.
- Schoepe M, Schrepper A, Schwarzer M, Osterholt M, Doenst T. 2012. Exercise can induce temporary mitochondrial and contractile dysfunction linked to impaired respiratory chain complex activity. *Metabolism*, 61 (1):117-126.
- Schwarzer M, Doenst T. 2009. Letter to the editor: "Does a reduction in ADP-limited respiration indicate impaired mitochondrial function?". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297 (2):H889; author reply 890.
- Schwarzer M, Schrepper A, Amorim PA, Osterholt M, Doenst T. 2013. Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria.
- Seifert EL, Bastianelli M, Aguer C, Moffat C, Estey C, Koch LG, Britton SL, Harper M-E. 2012. Intrinsic aerobic capacity correlates with greater inherent mitochondrial oxidative and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission capacities without major shifts in myosin heavy chain isoform.
- Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. 2003. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles.
- Smyers ME, Bachir KZ, Britton SL, Koch LG, Novak CM. 2015. Physically active rats lose more weight during calorie restriction. *Physiology & Behavior*, 139 (0):303-313.
- Sollanek KJ, Smuder AJ, Wiggs MP, Morton AB, Koch LG, Britton SL, Powers SK. 2015. Role of Intrinsic Aerobic Capacity and Ventilator-Induced Diaphragm Dysfunction.
- Stephenson EJ, Stepto NK, Koch LG, Britton SL, Hawley JA. 2012. Divergent skeletal muscle respiratory capacities in rats artificially selected for high and low running ability: a role for Nor1? *J Appl Physiol* (1985), 113 (9):1403-1412.
- Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. 2010. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sci*, 86 (1-2):39-44.
- Swaddle JP, Biewener AA. 2000. Exercise and reduced muscle mass in starlings. *Nature*, 406 (6796):585-586.

- Tate CA, Wolkowicz PE, McMillin-Wood J. 1982. Exercise-induced alterations of hepatic mitochondrial function. *Biochem J*, 208 (3):695-701.
- Thyfault JP, Rector RS, Uptergrove GM, Borengasser SJ, Morris EM, Wei Y, Laye MJ, Burant CF, Qi NR, Ridenhour SE, Koch LG, Britton SL, Ibdah JA. 2009. Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *The Journal of Physiology*, 587 (8):1805-1816.
- Tohkin M, Yoshimatsu N, Matsubara T. 1988. Comparison of the action of epinephrine and a respiratory chain uncoupler, 2,4-dinitrophenol, on  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization in isolated hepatocytes and perfused livers. *Jpn J Pharmacol*, 46 (1):61-69.
- Torma F, Koltai E, Nagy E, Ziaaldini MM, Posa A, Koch LG, Britton SL, Boldogh I, Radak Z. 2014. Exercise Increases Markers of Spermatogenesis in Rats Selectively Bred for Low Running Capacity. *PLoS ONE*, 9 (12):e114075.
- Wahren J, Felig P, Ahlborg G, Jorfeldt L. 1971. Glucose metabolism during leg exercise in man. *J Clin Invest*, 50 (12):2715-2725.
- Walsh B, Tonkonogi M, Sahlin K. 2001. Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Pflugers Arch*, 442 (3):420-425.
- Wang Y, Wisloff U, Kemi OJ. 2010. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiol Res*, 59 (5):633-644.
- Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernstrom M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, Britton SL. 2005. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307 (5708):418-420.
- Youngren JF, Keen S, Kulp JL, Tanner CJ, Houmard JA, Goldfine ID. 2001. Enhanced muscle insulin receptor autophosphorylation with short-term aerobic exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280 (3):E528-533.



## 10 Anhang

### 10.1 Weitere Daten

**Tabelle 16** - Herz SSM – maximale respiratorische Kapazität der verwendeten Fettsubstrate der trainierten und untrainierten HCR und LCR

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
Palmitoylcarnitin/Malat	275 ± 46	267 ± 43	299 ± 17	313 ± 41
PalmitoylCoA/Carnitin/Malat	195 ± 34	357 ± 52	283 ± 34	211 ± 24 <sup>ab</sup>

Daten sind in  $\text{nAO} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  Protein gezeigt. Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

**Tabelle 17** - Lebermitochondrien – Faktor aus maximaler respiratorischer Kapazität und ADP:O-Quotient

	LCR		HCR	
	Kontrolle	Trainiert	Kontrolle	Trainiert
Glutamat	281	300	342	331
Palmitoylcarnitin/Malat	261	258	332	315
Succinat/Rotenon	232	316	291	291

Daten sind in  $\frac{\text{nAO} \times \text{mg}}{\text{min}}$  gezeigt. Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler gezeigt. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$  vs. LCR mit gleicher Behandlung. <sup>b</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>bbb</sup>  $p < 0,001$  vs. Kontrolle

## 10.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> - Schematische Darstellung des Citratzyklus .....	11
<b>Abbildung 2</b> - Stark vereinfachte Darstellung der Atmungskette. ....	12
<b>Abbildung 3</b> - Übersicht des Protokolls der Mitochondrienisolation als Flussdiagramm.....	23
<b>Abbildung 4</b> - Reaktionsprinzip des Citratsynthase-Assays .....	24
<b>Abbildung 5</b> - Aufbau der Atmungskammer.....	25
<b>Abbildung 6</b> - Reaktionsgleichung in der Nulllösung.....	26
<b>Abbildung 7</b> - normaler Verlauf einer Atmungskurve .....	27
<b>Abbildung 8</b> - maximale Laufgeschwindigkeit im untrainierten Zustand (Kontrolltiere) .....	31
<b>Abbildung 9</b> - Citratsynthaseaktivität der Mitochondrien der Kontrolltiere in Herz, M. gastrocnemius und Leber .....	33
<b>Abbildung 10</b> - Maximale respiratorische Kapazitäten (State 3) .....	34
<b>Abbildung 11</b> - relatives Herzgewicht von untrainierten und trainierten HCR und LCR. ....	35
<b>Abbildung 12</b> - Herz IFM - maximale respiratorische Kapazität (State 3) .....	37
<b>Abbildung 13</b> - Herz SSM - maximale respiratorische Kapazität (State 3) .....	38/39
<b>Abbildung 14</b> - Gas IFM - maximale respiratorische Kapazität (State 3).....	40
<b>Abbildung 15</b> - Gas SSM –maximale respiratorische Kapazität (State 3) .....	41/42

### 10.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> - verwendete Geräte .....	16
<b>Tabelle 2</b> - verwendete Chemikalien .....	17
<b>Tabelle 3</b> - Herstellung von CP1 und CP2.....	19
<b>Tabelle 4</b> - Herstellung von 2xKM und KME .....	19
<b>Tabelle 5</b> - Herstellung von Wasch- und Isolationspuffer .....	20
<b>Tabelle 6</b> - Herstellung von KEA .....	20
<b>Tabelle 7</b> - Herstellung von Respirationsgemisch .....	20
<b>Tabelle 8</b> - Pipettierschema Citratsynthase-Assay.....	24
<b>Tabelle 9</b> - Pipettierschema der verwendeten Substrate .....	28
<b>Tabelle 10</b> - Alter und Tibialänge der HCR und LCR.....	32
<b>Tabelle 11</b> - Körper- und Organgewichte der HCR und LCR.....	32
<b>Tabelle 12</b> - Relative Größe und Komplexität der Mitochondrien .....	36
<b>Tabelle 13</b> - Citratsynthaseaktivitäten in Unit/mg Protein .....	36
<b>Tabelle 14</b> - Lebermitochondrien – maximale respiratorische Kapazität (State 3) der trainierten und untrainierten HCR und LCR .....	43
<b>Tabelle 15</b> - Lebermitochondrien - ADP:O der trainierten und untrainierten HCR und LCR .....	43
<b>Tabelle 16</b> - Herz SSM – maximale respiratorische Kapazität der verwendeten Fettsubstrate der trainierten und untrainierten HCR und LCR.....	65
<b>Tabelle 17</b> - Lebermitochondrien – Faktoren aus maximaler respiratorischer Kapazität und ADP:O-Quotient .....	65

## 10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. nat. Michael Schwarzer, Estelle Heyne

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

## 10.5 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Freunden, Verwandten und Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben, insbesondere bei:

**Prof. Dr. Torsten Doenst**, der mir ermöglichte diese Arbeit in seiner AG anzufertigen.

**Dr. Michael Schwarzer**, für die intensive und freundliche Betreuung, sowie den anderen Mitgliedern der AG Herz- und Thoraxchirurgie für die Diskussionsfreudigkeit und Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern **Monika** und **Rudolf Zeeb**, die mir das Studium und das freie Semester zum Durchführen der Experimente möglich gemacht haben und mir mit Zielstrebigkeit und Fleiß immer ein Vorbild sind.

**Estelle Heyne**, die mir jederzeit freundschaftlich und wissenschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand und mir zahlreiche Methoden in aller Feinheit beigebracht hat.

**Sebastian Seifarth**, für die ständige Motivation am Ball zu bleiben und die viele Geduld und Mühe die dabei notwendig war.